

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Dijana Podravac**

**METABOLIZAM DEOKSINIVALENOLA I ANALIZA NJEGOVIH**  
**BIOMARKERA**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, srpanj, 2016.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za primjenjenu kemiju i ekologiju  
Katedra za biokemiju i toksikologiju  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Znanost o hrani i Nutricionizam**

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Nutricionizam

**Nastavni predmet:** Prehrambena biokemija

**Tema rada** je prihvaćena na (IX) redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2015./2016. održanoj 28. lipnja 2016.

**Mentor:** doc. dr. sc. *Bojan Šarkanj*

**Pomoć pri izradi:**

**Metabolizam deoksinivalenola i analiza njegovih biomarkera**

*Dijana Podravac, 265-DI*

**Sažetak:** Mikotoksini su sekundarni metaboliti plijesni koje nastaju na polju ili tijekom skladištenja uroda te često kontaminiraju hranu. Deoksinivalenol (DON) i njegovi maskirani oblici su mikotoksini koje proizvode plijesni vrste *Fusarium* i najčešće kontaminiraju kukuruz, pšenicu, ječam i zob. Zbog svojeg štetnog utjecaja na zdravlje, potrebno je raditi na razvoju novih metoda njegovog određivanja kako bi se olakšala procjena rizika i procjena izloženosti. U ovom radu je istražena stopa izlučivanja i glukuronidacije DON-a pomoću biomarkera iz urina 49 dobrovoljaca nakon konzumacije namirnica s poznatim koncentracijama DON-a i njegovih metabolita. Za analizu urina korištena je multimikotoksinska metoda ultra visokodjelotvorne tekućinske kromatografije – tandemске masene spektrometrije (UHPLC-MS/MS). Analiza prvog jutarnjeg urina nakon dva dana pripreme za intervencijsku prehranu provedena je da bi se potvrdilo nepostojanje DON-a u urinu ispitanika koji bi mogao utjecati na rezultate prehrane jer se DON eliminira iz organizma unutar 24 sata. 24-satni urin trećeg intervencijskog dana potvrdio je da se većina DON-a izluči u obliku DON-15-glukuronida, nešto manje u slobodnom obliku, a ostatak u obliku DON-3-glukuronida koji kod nekih ispitanika nije bio ni detektiran zbog preniskih koncentracija DON-a u unesenoj hrani. Stopa izlučivanja bila je 82%, a stopa konjugacije 89%.

**Ključne riječi:** Deoksinivalenol, biomarkeri, LC-MS/MS, glukuronidi, urin

**Rad sadrži:** 56 stranica  
15 slika  
10 tablica  
0 priloga  
64 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |    |   |               |
|----|---|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. <i>Tomislav Krapec</i>        | predsjednik   |
| 2. | doc. dr. sc. <i>Bojan Šarkanj</i>           | član-mentor   |
| 3. | prof. dr. sc. <i>Daniela Čačić Kenjeric</i> | član          |
| 4. | doc. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i>           | zamjena člana |

**Datum obrane:** 15. srpnja 2016.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of applied chemistry and ecology  
Subdepartment of biochemistry and toxicology  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food science and Nutrition

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Course title:** Nutritional biochemistry

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. (IX) held on June 28, 2016.

**Mentor:** *Bojan Šarkanj*, PhD, assistant prof.

**Technical assistance:**

### Deoxynivalenol metabolism and analysis of its biomarkers

*Dijana Podravac*, 265-DI

**Summary:** Mycotoxins are secondary metabolites of molds that occur in the field or during storage of crops and often contaminate food. Deoxynivalenol (DON) and its masked forms are mycotoxins produced by *Fusarium* molds and commonly contaminate corn, wheat, barley and oats. Due to its harmful effects on health, it is necessary to work on the development of new methods of determining how to facilitate exposure and risk assessment. This work investigated the rate of excretion and glucuronidation of DON using biomarkers from urine of 49 volunteers after they consumed foods with known concentrations of DON and its metabolites. Multi-mycotoxin ultra high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UHPLC-MS / MS) method was used for urine analysis. Analysis of the first morning urine after two days of preparation for nutritional intervention was carried out to confirm absence of DON in the urine of subjects that could affect the results of the intervention because DON is eliminated from the body within 24 hours. 24-hour urine from the third intervention day confirmed that the majority of DON was excreted in the form of DON-15-glucuronide, a little less in the free form, and the rest in the form of DON-3-glucuronide which was not detected in some subjects because of low DON concentrations in their food. The rate of excretion and conjugation were 82% and 89%, respectively.

**Key words:** Deoxynivalenol, biomarkers, LC-MS/MS, glucuronides, urine

**Thesis contains:** 56 pages  
15 figures  
10 tables  
0 supplements  
64 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |    |   |              |
|----|---|--------------|
| 1. | <i>Tomislav Klapac</i> , PhD, prof.         | chair person |
| 2. | <i>Bojan Šarkanj</i> , PhD, assistant prof. | supervisor   |
| 3. | <i>Daniela Čačić Kenjerić</i> , PhD, prof.  | member       |
| 4. | <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, assistant prof. | stand-in     |

**Defense date:** July 15, 2016

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

*Ovaj Diplomski rad za mene predstavlja mnogo više od opisa jednog istraživanja – on za mene označava kraj jednog razdoblja života koji je bio obilježen i dobrim i lošim trenucima, brojim iskustvima i mnogim dobrim ljudima zbog kojih sam danas ovdje kao osoba koja jesam. To mi se, ipak, čini najvažnijim.*

*Zahvaljujem se mentoru doc.dr.sc. Bojanu Šarkanju na pomoći, vodstvu i ukazanom povjerenju da napravim svoj Diplomski rad te na pruženoj prilici da eksperimentalni dio svog rada odradim u Centru za analitiku, Odjelu za agrobiotehnologiju, BOKU, Tulln, Austrija. Hvala Vam što sam, uz sve Vaše obaveze, uvijek mogla računati na Vas i da ćete tražiti najviše od mene.*

*Zahvaljujem se prof.dr.sc. Tomislavu Klapetu na mnogobrojnim savjetima. Razgovori s Vama mnogo su mi pomogli u razumijevanju i zaokruživanju mog Diplomskog rada.*

*Hvala prof.dr.sc. Danieli Čačić Kenjeric što ste mi tijekom studiranja samo još jače produbili znatiželju i ljubav prema znanosti.*

*Hvala doc.dr.sc. Ivani Flanjak na korisnim savjetima, pomoći i materijalima koji su mi pomogli u izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se svima koji su svojim prijedlozima, savjetima, pomoći i podrškom pridonijeli izradi ovog rada i koji su sudjelovali u ovom dijelu mog života.*

*Hvala mom prijatelju Kruni kojem sam prvom rekla da sam tako iznenada i bez očekivanja upisala fakultet, a sada kad je konačno gotovo, žao mi je što nisi tu.*

*Najveća zahvala ipak ide onima koji vjerojatno neće razumjeti ništa što sam u svom Diplomskom radu pisala, ali bez njihove bezuvjetne ljubavi i svakodnevnih odricanja, ovo ne bi bilo moguće. Mojoj obitelji i prijateljima.*

*Mojoj mami i djedi, ovo je Vaše, ja sam obavila lakši dio posla.*

## Sadržaj

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Deoksinivalenol.....</b>	<b>5</b>
2.1.1	Pojavnost u hrani .....	7
2.1.2	Metabolizam .....	13
2.1.3	Biomarkeri izloženosti .....	19
2.1.4	Kreatinin u urinu.....	21
<b>2.2</b>	<b>UHPLC-ESI-MS/MS .....</b>	<b>23</b>
2.2.1	UHPLC.....	24
2.2.2	MS .....	26
2.2.3	ESI ionizacija .....	27
2.2.4	Princip rada trostrukog kvadrupola.....	29
<b>3</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>ZADATAK.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIJAL, METODE I ISPITANICI .....</b>	<b>33</b>
3.2.1	Kemikalije i reagensi.....	33
3.2.2	Ispitanici .....	33
3.2.3	Prikupljanje urina .....	35
3.2.4	Priprema uzoraka .....	36
3.2.5	Analiza uzoraka urina i uvjeti rada LC-MS/MS-a .....	36
3.2.6	Analiza kreatinina.....	37
<b>4</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>49</b>

### Popis oznaka, kratica i simbola

(U)HPLC	<i>(Ultra) high performance/pressure liquid chromatography</i> , (Ultra) visokodjelotvorna/visokotlačna tekućinska kromatografija
15-Ac-DON	15-acetil-deoksinivalenol
3-Ac-DON	3-acetil-deoksinivalenol
ACN	Acetonitril
ADME(T)	Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam, Ekskrecija (Toksičnost)
API	<i>Atmospheric pressure ionization</i> , Ionizacija kod atmosferskog tlaka
ARfD	<i>Acute Reference Dose</i> , Akutna referentna doza: najviša doza toksikanata koja se unese u organizam u roku 24 h ili kraćem, a koja neće izazvati toksičnu reakciju
BMI	<i>Body Mass Index</i> , Indeks tjelesne mase
CAD	<i>Collision Activated Dissociation</i> , Kolizijom aktivirana disocijacija
CC	<i>Collision Cell</i> , Kolizijska ćelija
CEM	<i>Continuous Electron Multiplier</i> , Kontinuirani množitelj elektrona
CEP	<i>Collision Cell Entrance Potential</i> , Ulazni potencijal kolizijske ćelije
CP	<i>Curtain plate</i> , Zastor plina
cps	<i>Counts Per Second</i> , Broj udaraca u sekundi
CXP	<i>Cell exit potential</i> , Izlazni potencijal kolizijske ćelije
DAS	Diacetoksiscirpenol
DF	Deflektor
DOM-1	De-epoksi deoksinivalenol
DOM-15-S	De-epoksi deoksinivalenol-15-sulfat
DOM-3-S	De-epoksi deoksinivalenol-3-sulfat
DON	Deoksinivalenol

DON-15-GlcA	Deoksinivalenol-15-glukuronid (Deoksinivalenol-15- <i>O</i> -glukuronid)
DON-15-S	Deoksinivalenol-15-sulfat
DON-3-Glc	Deoksinivalenol-3-glukozid
DON-3-GlcA	Deoksinivalenol-3-glukuronid (Deoksinivalenol-3- <i>O</i> -glukuronid)
DON-3-S	Deoksinivalenol-3-sulfat
DON-7-GlcA	Deoksinivalenol-7-glukuronid (Deoksinivalenol-7- <i>O</i> -glukuronid)
DON-8-GlcA	Deoksinivalenol-8-glukuronid (Deoksinivalenol-8- <i>O</i> -glukuronid)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> , Europska agencija za sigurnost hrane
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, Enzimski imuno-test
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> , Ionizacija elektroraspršenjem
FAO	<i>Food and agriculture organization</i> , Organizacija za hranu i poljoprivredu
FB <sub>1</sub>	Fumozin B <sub>1</sub>
FB <sub>2</sub>	Fumozin B <sub>2</sub>
FUM	Fumonizin
HAH	Hrvatska agencija za hranu
HT-2	HT-2 toksin
JEFCA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i> , Zajedničko stručno vijeće Organizacije za hranu i poljoprivredu i Svjetske zdravstvene organizacije za prehrambene aditive
LC-MS/MS	Tekućinska kromatografija tandemaska masena spektrometrija
LIT	<i>Linear ion trap</i> , Linearni hvatač iona
LOD	<i>Limit of detection</i> , Limit detekcije
LOQ	<i>Limit of quantification</i> , Limit kvantifikacije
m/z	Omjer mase i naboja
MAS	Monoacetoksiscirpenol

MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> , Praćenje višestrukih reakcija
MS	<i>Mass spectrometry</i> , Masena spektrometrija
MW	<i>Molecular weight</i> , Molekulska masa
NEO	Neosolaniol
NIV	Nivalenol
OTA	Ohratoksin A
Q1	Prvi kvadrupol
q2	Drugi kvadrupol
Q3	Treći kvadrupol
QqQ	<i>Triple Quadrupole</i> , Trostruki kvadrupol
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i> , Praćenje određene reakcije
T-2	T-2 toksin
TDI	<i>Tolerable Daily Intake</i> , Tolerirani dnevni unos – mjera izloženosti koja čak i unosom tijekom čitavog životnog vijeka neće izazvati nikakve štetne posljedice
ZEA	Zearalenon
ZEA-14-GlcA	Zearalenon-14- <i>O</i> -glukuronid
$\alpha$ - i $\beta$ -ZEL	$\alpha$ - i $\beta$ -zearalenol





Deoksinivalenol (DON) je mikotoksin koji proizvode plijesni roda *Fusarium*, a pripada skupini trihotecena (EFSA, 2013). Osim DON-a, problem je i u postojanju tzv. „maskiranih mikotoksina“ koji su produkt metabolizma biljke, a kod DON-a su to glukozidi (Rychlik i sur., 2014) koji se u probavnom traktu mogu hidrolizirati nazad u DON koji je toksičniji (Nijs i sur., 2012).

DON najčešće nastaje na polju, ali može i tijekom skladištenja te je u velikoj mjeri otporan na preradu, zbog čega je potrebno kontrolirati razinu u hrani i hrani za životinje (Rocha i sur., 2014). Na razvoj mikotoksina utječu klimatski uvjeti kao što su povećana vlaga i visoka temperatura (Battilani i sur., 2013) te fizička oštećenja i samo prisustvo spora plijesni u sjemenu ili zemlji koje su zaostale od prethodne sezone (Pleadin i sur., 2013). Nakon što 1972. je otkriven DON, proveden je velik broj istraživanja o njegovoj toksičnosti, pojavnosti, redukciji i metabolizmu na biljkama, životinjama i ljudima, ali trenutna saznanja, naročito o njegovom metabolizmu kod ljudi i različitih vrsta životinja, još nisu potpuna (Schwartz-Zimmermann i sur., 2015).

Naziv „vomitoksin“ je dobio zbog toga što prvenstveno uzrokuje povraćanje, ali i druge gastrointestinalne probleme. Takve epidemije trovanja hranom kontaminiranom DON-om su većinom bile povezane sa zemljama u razvoju zbog nepostojanja regulative ili slabog nadzora u provođenju kontrola (Turner i sur., 2012). Međutim, prema izvješću Europske agencije za sigurnost hrane iz 2013. i populacija iz razvijenih zemalja je u riziku od prekoračenja tolerirane dnevne doze (TDI) koja iznosi  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase (EFSA, 2013).

Jedno od provedenih istraživanja u poljima Hrvatske dokazalo je da je 85% uzoraka kukuruza kontaminirano DON-om (Pleadin i sur., 2012). Višegodišnje studije u Hrvatskoj otkrivaju česte kontaminacije žitaricama mikotoksinima, a kako bi se izbjegli štetni utjecaji na zdravlje ljudi i životinja te ekonomski gubici prehrambene i poljoprivredne industrije, potrebno je provoditi sustavnu kontrolu mikotoksina u hrani i hrani za životinje (HAH, 2012).

Kako bi se istražila izloženost ljudi, Meky i sur. (2003) su započeli na razvoju metode koja je kao biomarker izloženosti koristila ukupni DON (slobodni DON + njegovi glukuronidi) iz urina nakon hidrolize  $\beta$ -glukuronidazom. Metoda se dalje razvijala kako bi joj se skratilo vrijeme utrošeno na enzimsku hidrolizu i pročišćavanje te je razvojem standarda deoksinivalenol-3-glukuronida (DON-3-GlcA) i deoksinivalenol-15-glukuronida (DON-15-GlcA) (Warth i sur., 2012a) napokon bilo moguće izbaciti taj korak u postupku analize DON-a iz urina te dobiti

selektivnu i specifičnu metodu koja je brža, jednostavnija i daje ponovljive rezultate. LC-MS/MS metoda je jedna od najbržih i najspecifičnijih multimikotoksinskih metoda koja se danas najčešće primjenjuje za ovaj tip analiza.

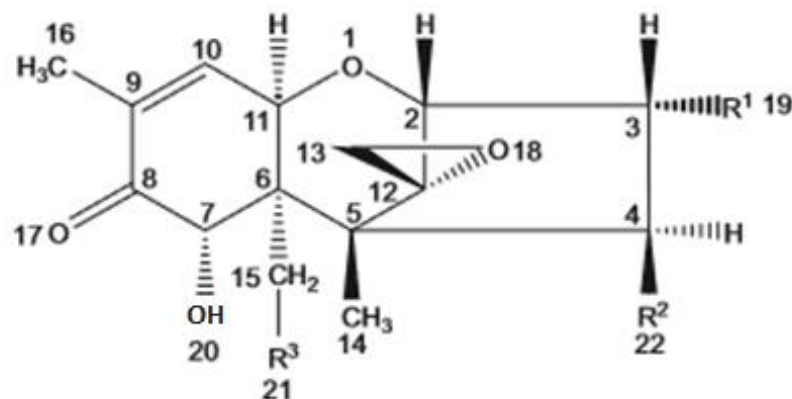
Ovaj rad je baziran na nadograđenoj multimikotoksinskoj LC-MS/MS metodi opisanoj u radu Wartha i sur. (2012a), a cilj je bio ispitati izlučivanje deoksinivalenola i njegovih metabolita iz urina 49 ispitanika kako bi se utvrdila veza između izloženosti u hrani i biomarkera iz urina.



## 2.1 DEOKSINIVALENOL

Mikotoksin deoksinivalenol (DON) je sekundarni metabolit plijesni roda *Fusarium*, a pripada skupini trihotecena koja sadrži više od 200 strukturno povezanih mikotoksina niske molekularne mase (od 200 do 500 Da). Trihoteceni su seskviterpenoidi sa dvostrukom vezom između C-9 i C-10 te epoksidom između C-12 i C-13. Ostale skupine različito utječu na njihovu toksičnost (Pestka, 2010). DON i njegovi metaboliti imaju keto skupinu na C-8 i nazivaju se još i 8-keto-trihoteceni (trihoteceni B skupine) (Döll i Dänicke, 2011; Rodrigues i sur., 2002). DON je strukturno sličan toksičnijem T-2 toksinu koji na C-8 ima estersku vezu, a zajedno s HT-2 toksinom, T-2 tetraolom, neosolaniolom (NEO), diacetoksiscirpenolom (DAS) i 15-monoacetoksiscirpenolom (MAS) pripada trihotecenima skupine A (Döll i Dänicke, 2011). Trihoteceni su bezbojni, najčešće kristalični te topljivi u polarnim organskim otapalima kao što su vodena otopina metanola, acetonitril i etil acetat, ali manje topljivi u vodi (Rodrigues i sur., 2002; Döll i Dänicke, 2011) uz iznimku DON-a koji je dobro topljiv u vodi ( $5,5 \text{ g L}^{-1}$ ). DON je prema nekim autorima stabilan na  $120^{\circ}\text{C}$ , a umjereno stabilan na  $180^{\circ}\text{C}$  (Döll i Dänicke, 2011), dok prema drugim autorima degradacija kreće već na  $125^{\circ}\text{C}$  (Vidal i sur., 2015). Deoksinivalenol je također poznat kao 12,13-epoksi-3,7,15-trihidroksi-trihotek-9-en-8-on, kao vomitoksin, dehidronivalenol, 4-deoksinivalenol te RD-toksin (Turner i sur., 2012). Naziv „vomitoksin“ je dobio zbog toga što uzrokuje povraćanje. Molekulska formula mu je  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$ , a molekulska masa mu je  $296,32 \text{ g mol}^{-1}$  (Döll i Dänicke, 2011). **Slika 1** prikazuje kemijsku strukturu trihotecena skupine B, a u **Tablici 1** su razlike između funkcionalnih skupina trihotecena skupine B (Turner i sur., 2012).

Najčešće nastaje na kontaminiranoj pšenici, ječmu i kukuruzu uzrokujući prvenstveno probavne smetnje. Kod eksperimentalnih životinja hranjenih DON-om primijećeni su teži simptomi kao što su: sporiji rast i slab imunološki sustav kod nižih doza te dijareja, povraćanje, leukocitoza, krvarenje, nateknuće stidnice i rodnice, i smrt kod visokih doza (Döll i Dänicke, 2011; Pestka, 2010). DON može nastati na polju prije žetve ili nakon žetve, a budući da je otporan na procesiranje nužna je njegova kontrola u namirnicama (Rocha i sur., 2014). Prema podacima koji se nalaze na stranicama FAO gruba procjena je da je do 50% žitarica kontaminirano mikotoksinima (FAO, 2016).

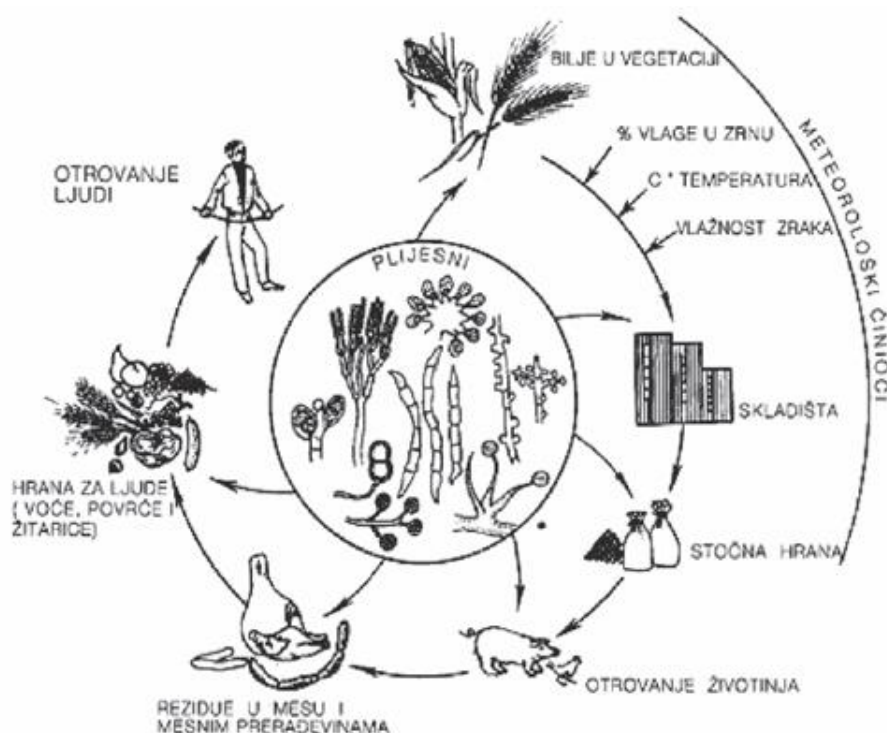


**Slika 1** Kemijska struktura trihotecena skupine B (prilagođeno iz Turner i sur., 2012)

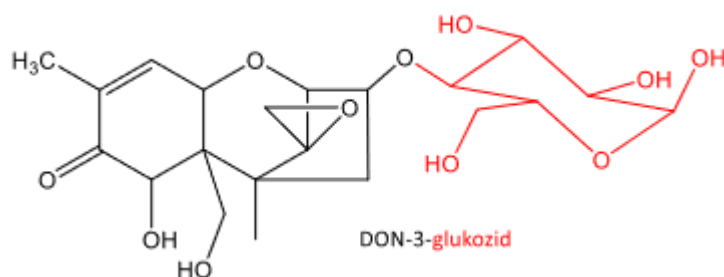
**Tablica 1** Razlike između funkcionalnih skupina trihotecena skupine B (Turner i sur., 2012)

Trihoteceni B skupine	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Nivalenol	OH	OH	OH
Deoksinivalenol	OH	H	OH
3-acetil-deoksinivalenol	OCOCH <sub>3</sub>	H	OH
15-acetil-deoksinivalenol	OH	H	OCOCH <sub>3</sub>
Fuzarenon X	OH	OCOCH <sub>3</sub>	OH

Mikotoksini mogu ući u ljudski ili životinjski hranidbeni lanac direktno ili indirektno. Indirektna kontaminacija se događa kada je hrana bila zahvaćena plijesnima koje su tijekom procesa obrade uklonjene, ali su na njoj zaostali mikotoksini ili prijenosom mikotoksina iz krmiva u namirnice životinjskog podrijetla. Direktna kontaminacija označava hranu i hranu za životinje koja sadrži plijesni te mikotoksine kao nusprodukte njihovog metabolizma. Osim hrane biljnog podrijetla, mikotoksine je moguće unijeti u organizam i preko mlijeka, sira, mesa te drugih namirnica životinjskog podrijetla (Rocha i sur., 2014). **Slika 2** prikazuje put mikotoksina u hranidbenom lancu. Problem pri prepoznavanju kontaminiranosti mikotoksinima su tzv. maskirani mikotoksini koji se u hrani nalaze u promijenjenom obliku zbog čega je otežana analiza. Najčešće su kemijski vezani sa šećerom (**Slika 3** DON-3-Glc (deoksinivalenol-3-glukozid)), ali mogu biti vezani acetatnim ili sulfatnim skupinama kao što su 3-Ac-DON (3-acetil-deoksinivalenol) i 15-Ac-DON (15-acetil-deoksinivalenol) te sulfatni konjugati (DON-3-S, te DON-15-S). Takvi maskirani metaboliti se djelovanjem crijevne mikrobiote mogu osloboditi u slobodan oblik mikotoksina te djelovati toksično (Klapec i Šarkanj, 2016; Turner i sur., 2012).



**Slika 2** Put mikotoksina u hranidbenom lancu (Ožegović i Pepelnjak, 1995)



**Slika 3** Struktura DON-3-Glc (Klapec i Šarkanj, 2016)

### 2.1.1 Pojavnost u hrani

Trihoteceni iz skupine A i B se najčešće nalaze u pšenici, kukuruzu, ječmu i zobi, a mogu se naći i u prerađenim proizvodima: brašnu, kukuruznim pahuljicama, hrani za dojenčad, sladu i pivu, a DON je prvi put izoliran iz oštećenih zrna ječma 1972. godine. DON se najčešće nalazi u žitaricama kao što su pšenica, ječam i kukuruz, a nešto rjeđe kod zobi, riže i raži (HAH, 2012). Najčešće je povezan s plijesni *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) i *Fusarium culmorum* koje su ozbiljni patogeni te uzrokuju fuzarijsku palež klasa kod pšenice i *Gibberella* trulež klipa kod kukuruza (Turner i sur., 2012). Na **Slici 4** se vide primjeri kontaminacije.



(a)

(b)

**Slika 4** (a) Fuzarijska palež klasa (North Dakota State University, 2016) (b) Trulež klipa kukuruza (Pioneer, 2016)

Prema podacima izvješća Hrvatske agencije za hranu (HAH) DON je stabilan tijekom skladištenja te procesiranja, a može se naći i u mlijeku i mesu, ali preživači DON metaboliziraju u de-epoksi deoksinivalenol (DOM-1) koji je manje toksičan. DON i njegovi metaboliti se iz organizma izlučuju urinom, ali i mlijekom u manjim koncentracijama.

Za pojavu plijesni i mikotoksina odgovorni su:

- odgovarajući sadržaj vlage (slobodna ili aktivna voda),
- pogodne temperature,
- prisutnost kisika,
- fizička oštećenja na usjevima i
- prisutnost gljivičnih spora (HAH, 2012).

U razvijenim zemljama su razine DON-a u namirnicama zakonski regulirane pa ne predstavljaju značajni rizik za ljudsko zdravlje, ali u zemljama u razvoju regulative ne postoje ili se monitoring slabo provodi zbog čega je rizik od česte izloženosti visokim dozama veći. Iako rizik svugdje postoji, utjecaj na zdravlje ljudi je slabo istražen. Tijekom dvadesetog stoljeća, mikotoksini su često bili povezani s epidemijama trovanja hranom, a DON je u takvoj hrani bio pronađen često i u visokim dozama i to najčešće u Kini i Indiji (Turner i sur., 2012). U Indiji je 1987. prijavljen velik broj gastrointestinalnih problema za koje se ispostavilo da su povezani s konzumacijom kruha koji je bio kontaminiran mikotoksinima (Bhat i sur., 1989). U Kini su Lou i sur. (1990) zbog učestalih akutnih trovanja usporedili koncentracije uzoraka kukuruza i



pšenice sa ispitanicima iz dvije pokrajine od kojih je jedna imala visoki, a druga niski rizik od nastanka raka jednjaka. U visoko-rizičnoj pokrajini su rezultati analize pokazali da je kukuruz sadržavao 5,8 puta veću koncentraciju DON-a i 2,6 puta veću koncentraciju 15-Ac-DON-a nego u nisko-rizičnoj pokrajini, a pšenica je imala 3,3 puta veću koncentraciju DON-a od pšenice u nisko-rizičnoj regiji Kine (Lou i sur., 1990). Simptomi trovanja su slični simptomima koje su imale životinje izložene DON-u, uključujući abdominalne grčeve, povraćanje, dijareju, glavobolje i vrtoglavice. Unatoč čestim trovanjima, nije uvijek bilo moguće utvrditi da je DON uzrok zbog neprikladnog uzorkovanja ili korištenih analitičkih metoda, zbog neprikladnih kontrolnih osoba ili kontrolne osobe uopće nisu bile obuhvaćene istraživanjem te zato što biomarkeri izloženosti nisu bili poznati. Trenutno poznati biomarkeri otkrivaju da je izloženost DON-u česta čak i u razvijenim zemljama (Turner i sur., 2012; Šarkanj i sur., 2013).

Mitak i sur. (2004) su proveli istraživanje na području Republike Hrvatske 1999. godine na kukuruzu imunoenzimskom analizom. Od 28 uzoraka, 18 uzoraka (64,29%) je bilo kontaminirano DON-om u koncentracijama od 30 do više od 2000 ng mL<sup>-1</sup>. Od toga, 8 je uzoraka sadržavalo DON u koncentracijama koje su mogle utjecati na zdravlje svinja. Rezultati istraživanja prikazani su u **Tablici 2** (Mitak i sur., 2004).

**Tablica 2** Sadržaj deoksinivalenola u uzorcima kukuruza iz 1999. godine (Mitak i sur., 2004)

Redni broj	Deoksinivalenol (ng mL <sup>-1</sup> )	Redni broj	Deoksinivalenol (ng mL <sup>-1</sup> )
1.	<LOD	15.	150
2.	720	16.	990
3.	1585	17.	850
4.	240	18.	>2000
5.	<LOD	19.	<LOD
6.	375	20.	1200
7.	170	21.	>2000
8.	190	22.	430
9.	1040	23.	<LOD
10.	155	24.	<LOD
11.	<LOD	25.	<LOD
12.	200	26.	<LOD
13.	190	27.	<LOD
14.	425	28.	<LOD

U kolovozu 2010. godine prikupljeno je i analizirano 40 uzoraka kukuruza iz sjevernog, središnjeg i istočnog dijela Hrvatske (Pleadin i sur., 2012). U 85% uzoraka je pronađena kontaminacija DON-om s maksimalnom koncentracijom od  $17,92 \text{ mg kg}^{-1}$ , a u 87,5% s maksimalnom koncentracijom od  $5,11 \text{ mg kg}^{-1}$  pronađen je ZEA (zearalenon). Tako visoki rezultati objašnjeni su visokom vlagom zbog ekstremno puno padalina tijekom perioda rasta te niskim temperaturama koje su mogle pogodovati rastu *Fusarium* plijesni i proizvodnji njihovih sekundarnih metabolita (Pleadin i sur., 2012). Pleadin i sur. (2013) su u 2011. godini proveli još jedno istraživanje koje je obuhvatilo 181 uzorak kukuruza, pšenice, ječma i zobi iz šest različitih regija Hrvatske. Koristeći ELISA metodu određivani su DON, ZEA, FUM (fumonizini B1 i B2) i T-2 toksin. Od svih žitarica, kukuruz je imao najveću stopu kontaminacije sa DON-om kao najzastupljenijim kontaminantom (52,5%), zatim ZEA (40,5%), FUM (37,5%) i T-2 toksinom (33,0%). Četiri uzorka kukuruza i jedan uzorak pšenice su imala koncentraciju mikotoksina veću od dozvoljene. S obzirom da je to bio vremenski suh i topao period, pretpostavili su da je kontaminacija povezana s drugim čimbenicima osim klimatskih. U **Tablici 3** su prikazane koncentracije DON-a u četiri različite žitarice.

**Tablica 3** Koncentracije DON-a u žitaricama iz 2011. godine iz šest različitih Hrvatskih regija (prilagođeno iz Pleadin i sur., 2013)

Žitarica	Broj pozitivnih/ broj ukupnih uzoraka	Postotak pozitivnih uzoraka (%)	Srednja vrijednost pozitivnih uzoraka ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	SD (standardna devijacija) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Min ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Max ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Kukuruz	45/63	71	1565	2915	215	2942
Pšenica	33/51	65	223	53	115	278
Ječam	18/34	53	342	91	74	228
Zob	7/33	21	145	84	34	201

Tijekom 2004. i 2005. godine je provedeno istraživanje 139 uzoraka žitarica na području Srbije, od čega je bilo 76 uzoraka kukuruza, 16 uzoraka pšenice, 24 soje, 19 suncokreta i 4 uzorka ječma. DON je određivan tekućinskom kromatografijom s DAD detektorom (detektor s nizom dioda). Prosjek pojavnosti DON-a u te dvije godine bio je 44,7% u kukuruzu, 37,5% u pšenici, 47,4% u suncokretu, 8,3% u soji te 25,0% u ječmu. Koncentracija DON-a u kontaminiranim uzorcima je bila od 0,04 do  $2,46 \mu\text{g g}^{-1}$ . Samo su tri uzorka imala koncentraciju DON-a veću od maksimalno dozvoljene prema Europskoj Komisiji (Jajić i sur., 2008).

U preglednom radu Döll i Dänicke (2011) su prikuplili literaturu pomoću koje je sastavljena **Tablica 4** u kojoj je vidljiva kontaminacija žitarica država Europe DON-om. Vidljivo je da je kukuruz najčešće kontaminiran s najvećom srednjom vrijednošću kontaminacije, iza čega se nalazi pšenica, ali kod nekih uzoraka pšenice su uočene daleko najviše koncentracije DON-a u usporedbi s ostalim žitaricama. Pšenica je analizirana najčešće od svih žitarica zbog svoje veće rasprostranjenosti i češće uporabe od ostalih u prehrambenoj industriji za prehranu ljudi.

**Tablica 4** Kontaminacija žitarica DON-om sa područja Europe iz 2003. godine (Döll i Dänicke, 2011)

Žitarica	N (broj uzoraka)	Pozitivni uzorci (%)	Maksimum (mg kg <sup>-1</sup> )	Srednja vrijednost (mg kg <sup>-1</sup> )
Pšenica	6358	61	50,000	0,293
Kukuruz	520	89	8,850	0,660
Ječam	781	47	0,619	0,106
Zob	595	33	5,004	0,253
Riža	271	41	0,595	0,095

Znanstveni odbor za hranu (SCF – Scientific Committee for Food) je 2002. godine donio privremenu odredbu za tolerirani dnevni unos za DON od 1 µg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase na dan. JEFCA je 2010. proširila odluku na DON i njegove acetilirane derivate (3-Ac-DON i 15-Ac-DON) i postavila ARfD (Akutna referentna doza) na 8 µg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase. EFSA je u svom izvješću iz 2013. godine obuhvatila istraživanja u periodu od 2007. do 2012. godine iz 21 države članice Europske Unije na 18884 uzorka s ukupno 26613 rezultata o DON-u i njegovim metabolitima. DON je pronađen u 44,6% neprocesiranih žitarica, 43,5% uzoraka hrane i u 75,2% uzoraka hrane za životinje, a 0,8% uzoraka hrane i 1,7% uzoraka hrane za životinje je premašivalo maksimalne količine DON-a. Također je najčešće pronađen u kukuruzu, zatim pšenici te zobi u odnosu na druge žitarice. Koncentracija DON-a je bila značajno viša u pšeničnim mekinjama od drugih proizvoda meljave pšenice. U procesiranim proizvodima (kruh, peciva, žitarice za doručak, tjestenina) je koncentracija bila niža u usporedbi s neprocesiranim. Hrana za životinje je bila najviše kontaminirana, a među različitim vrstama hrane za životinje, najveća kontaminacija je bila kod hrane za perad, jer je perad najmanje osjetljiva na štetno djelovanje DON-a. Derivati DON-a, 3-Ac-DON i 15-Ac-DON su rjeđe pronađeni i u manjim koncentracijama od DON-a, a skoro u svakom slučaju kada su bili kvantificirani, uzorak je

sadržavao i DON. Od ukupnog DON-a, 3-Ac-DON je bio zastupljen sa 2 do 20%, a 15-Ac-DON sa 10 do 15%. DON-3-Glc je rijetko službeno praćen u istraživanjima, samo u Češkoj, a u uzorcima u kojima je pronađen je zastupljen sa oko 5% od ukupne kontaminacije DON-om i metabolitima (EFSA, 2013).

Dojenčad i djeca su najizloženije grupe kada se razmatrala **kronična izloženost** i procijenjena je za prosjek u rasponu od 0,54 do 1,02  $\mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase na dan te za 95. percentil između 0,95 i 1,86  $\mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase na dan. Kronična izloženost adolescenata, odraslih i starijih osoba je u prosjeku bila u rasponu od 0,22 do 0,58  $\mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase na dan i za 95. percentil od 0,43 do 1,08  $\mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase na dan. U skoro svim skupinama populacije, kruh i peciva su bili glavni izvori kontaminacije sa 30,9 – 72,3% ukupne izloženosti. U nekim skupinama, tjestenina je na kroničnu izloženost utjecala i do 63,8% od ukupne izloženosti, fini pekarski proizvodi do 43,1% te proizvodi meljave žitarica do 76,9%. Kada je riječ o **akutnoj izloženosti** iznad 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase, kod dojenčadi i djece pojavljivala se u 0,04 – 0,17% slučajeva, a kod adolescenata, odraslih i starijih osoba u 0 – 0,09% slučajeva. Akutnim dozama u trajanju više od jednog dana bilo je izloženo više od 0,7% populacije, a tome je najviše doprinijela konzumacija finih pekarskih proizvoda u svim dobnim skupinama, osim u slučaju dojenčadi kod koje su najviše utjecali proizvodi meljave žitarica. Kronična izloženost životinja je bila između 3,9 i 43,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase na dan, a akutna između 11,6 i 137,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase. Među životinjama, najizloženije DON-u su perad (kokoši, pure, patke), zatim svinje pa tek onda ostale životinje (EFSA, 2013).

Važnost praćenja kontaminacije mikotoksina proistječe iz činjenice da je gotovo nemoguće očekivati nekontaminirane žitarice zbog sveprisutnog pojavljivanja odgovornih plijesni. Takozvane plijesni skladištenja se u nekoj mjeri mogu kontrolirati pravilnim uvjetima čuvanja kao što su održavanje temperature (ispod 10°C) i vlažnosti te  $a_w$  (aktivitet vode) (ispod 0,85). Plijesni koje su dio prirodne mikroflore već na polju je moguće kontrolirati samo do određene granice. Rizici nastanka mikotoksina su: klima, obrada zemlje, kukuruz kao prethodno uzgajana žitarica, zaštita žitarica, dohranjivanje biljaka. Bitno je polje preorati i odstraniti zaostale biljke od posljednje sezone, naročito ako je riječ o kukuruzu te redovito izmjenjivati sadnju vrsta biljaka, uz izbjegavanje srodnih vrsta. Poželjno je biljke dohranjivati i žetvu obaviti u roku i pod povoljnim klimatskim uvjetima (Döll i Dänicke, 2011).

### 2.1.2 Metabolizam

Prvo istraživanje metabolizma DON-a proveli su Yoshizawa i sur. (1983) na urinu i fecesu **štakora**. Ustanovljeno je da je došlo do de-epoksidacije, a novopronađeni metabolit je nazvan de-epoksi deoksinivalenol (DOM-1) te je imao jedan atom kisika manje od DON-a. Worrell i sur. (1989) su potvrdili ovo otkriće, s tim da su otkrili da je za de-epoksidaciju zaslužna crijevna mikrobiota jer kada su štakori hranjeni DON-om i tretirani antibioticima, u urinu i fecesu je bilo značajno manje de-epoksi metabolita. Inkubacija DON-a s jetrenim homogenatom nije rezultirala nastankom DOM-1 pa je zaključeno da jetreni metabolizam nije moguć kod štakora, a metabolit DON-a u organizmu štakora je DOM-1 koji je rezultat mikrobnog metabolizma iz probavnog trakta (Wu i sur., 2010).

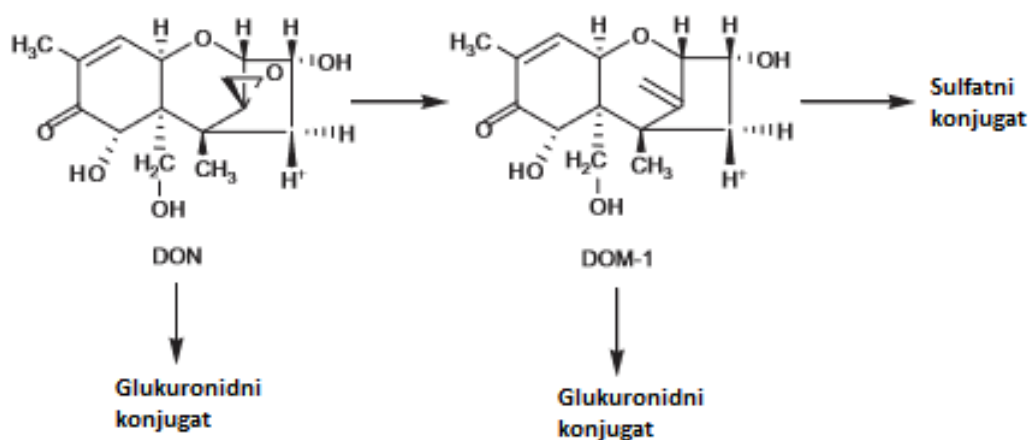
Istraživanja na **svinjama** su dokazala da je DON toksičniji za njih od drugih životinja jer je njihov metabolizam DON-a slabiji. Svinje su oralno primile 0,6 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase te intravenozno 0,3 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase DON-a označenim <sup>14</sup>C te im je tijekom 24 sata prikupljana krv, urin, žuč i feces koji su analizirani pomoću plinske kromatografije s masenim spektrometrom (GC-MS). Oko 95% DON-a je bilo izlučeno, a iako glukuronidi DON-a nisu pronađeni, u slučaju kad se urin i žuč tretirala β-glukuronidazom dokazano je njihovo postojanje (Prelusky i sur., 1987a). Međutim, u novijem istraživanju su Nagl i sur. (2014) potvrdili da je riječ o DON-3-GlcA i DON-15-GlcA. Oni su proučavali metabolizam maskiranog oblika DON-a, DON-3-Glc-a oralnim i intravenoznim unosom na četiri svinje. Nakon oralnog unosa DON-a i DON-3-Glc-a, u urinu je izlučeno 84,8 ± 9,7% DON-a i 40,3 ± 8,5% DON-3-Glc-a. Od ukupno izlučenog DON-3-Glc-a, samo je 2,6 ± 1,4% bilo u tom obliku, a ostatak je bio u obliku DON-a, DON-3-GlcA, DOM-1 i DON-15-GlcA. Intravenozno unesen DON-3-Glc je skoro u potpunosti izlučen nepromijenjen što upućuje na to da se DON-3-Glc u probavnom traktu svinja gotovo u cijelosti hidrolizira (Nagl i sur., 2014). U serumu nije pronađen DOM-1, a samo u tragovima je pronađen u želucu i tankom crijevu, dok je u većim količinama pronađen u silaznom dijelu debelog crijeva jer se većim dijelom izlučuje urinom. Također su proučavani apsorpcija, metabolizam i izlučivanje 3-Ac-DON-a kod svinja nakon što su tijekom 2,5 dana hranjene komercijalnom hranom kontaminiranom 3-Ac-DON-om u koncentraciji od 2,5 mg kg<sup>-1</sup>. U plazmi, urinu i fecesu nisu pronađeni 3-Ac-DON i njegovi de-epoksidni oblici, a već 20 minuta nakon početka hranjenja, u plazmi je detektiran DON. Najveća koncentracija DON-a u plazmi je bila nakon tri sata nakon čega se ubrzano smanjivala, a nakon osam sati je koncentracija bila niska i blizu limita

detekcije. Značajan udio DON-a u plazmi predstavljali su glukuronidni konjugati ( $42 \pm 7\%$ ), a 60 sati od izloženosti više nije bilo DON-a u plazmi. DON se najviše izlučio urinom ( $45 \pm 26\%$  od ukupno konzumiranog mikotoksina), a u fecesu su pronađene samo male količine metabolita 3-Ac-DON-a ( $2 \pm 0,4\%$ ), veća količina 3-Ac-DOM-1 ( $52 \pm 15\%$ ) i ostatak je bio DON što opet navodi na zaključak da su svinje osjetljivije na DON (Eriksen i sur., 2003). Metaboliti DON-a kod svinja su DOM-1 i glukuronidni konjugati DON-a. Acetilirani oblici toksina se deacetiliraju te transformiraju u DOM-1 *in vivo*, a pronađeni su u žuči i bubrezima, dok se de-epoksidi ne mogu pronaći u urinu i plazmi svinja (Döll i sur., 2008). De-epoksidi acetiliranih oblika koji su pronađeni u urinu i plazmi štakora dospjeli su tamo jer su štakori koprofagi (Eriksen i Pettersson, 2004).

Kod **preživača** je provedeno istraživanje u kojem je DON inkubiran u tekućini iz buraga tijekom 24 sata prilikom čega se cijeli transformirao u svoj de-epoksidni oblik. Identificiran je samo DOM-1 pomoću infracrvene i ultraljubičaste spektrometrije (IR i UV), masene spektrometrije (MS) i nuklearne magnetne rezonance (NMR). Tijekom inkubacije je 3-Ac-DON deacetiliran u DON nakon čega je provedena de-epoksidacija pomoću bakterija i praživotinja koje se nalaze u buragu (King i sur., 1984). U *in vivo* istraživanju je potvrđeno da krave mogu metabolizirati DON u DOM-1 tako što su Holstein krave u laktaciji hranjene dva puta na dan tijekom pet uzastopnih dana kukuruzom kontaminiranim DON-om, nakon čega je pomoću GC-MS rađena analiza na mlijeku, urinu te plazmi. DOM-1 je pronađen u svim ispitivanim uzorcima. Budući da DOM-1 može prijeći krvnom cirkulacijom u mlijeko, smatra se da je i on prikladan biomarker za procjenu unosa DON-a kod preživača (Yoshizawa i sur., 1986). Metabolizam DON-a kod ovaca u laktaciji je određivan pomoću  $^{14}\text{C}$  označenog DON-a (kombinacijom radioizotopskih i kromatografskih tehnika) te je otkriveno sedam metabolita. Najviše DON-a i njegovih metabolita je izlučeno urinom (91%) te žuči (6%). Glukuronidni konjugati činili su 67%, DOM-1 13%, DON 11%, sulfatni konjugati DON-a 2% te su utvrđena još tri neidentificirana metabolita od ukupno izlučenih radioaktivnih komponenata. Preživači su zbog načina prehrane morali prilagoditi metabolizam pa su puno otporniji na DOM i njegove metabolite (Prelusky i sur., 1987 b).

DON kod **peradi** može biti transformiran u DOM-1 u debelom crijevu, a nizak pH inhibira njegovu transformaciju. Zaključeno je da se 3-Ac-DON može metabolizirati u DON i DOM-1, dok 15-Ac-DON rezultira direktnim nastankom 15-Ac-DOM-1 (Wu i sur., 2010). Schwartz-

Zimmermann i sur. (2015) su u nedavnom istraživanju pomoću LC-MS/MS metode i kemijski sintetiziranog standarda deoksinivalenol-3-sulfata (DON-3-S) dokazali da je on glavni metabolit kod peradi. Nakon unosa DON-a, on se jako brzo apsorbirao u dvanaesniku, a zatim u mukoznim stanicama, jetri i bubrezima metabolizirao te izlučio putem žuči i urina u obliku DON-3-sulfata, a kod unosa DOM-1, brzo je došlo do transformacije u deepoksi-deoksinivalenol-3-sulfat (DOM-3-S), a taj metabolički put DON-a je prikazan **Slikom 5** (Wu i sur., 2010). Biološko iskorištenje oralno unesenog DON-a u obliku DON-3-S i DOM-3-S kod kokoši je bilo blizu 100%, a iako su pure pokazivale znakove sličnog metabolizma, kod njih je iskorištenje bilo između 50% i 70% što upućuje na to da je izlučivanje metabolita DON-a i DOM-1 brže kod kokoši, nego kod pura. Da bi se usporedila toksičnost DON-a, DON-3-sulfata i deoksinivalenol-15-sulfata (DON-15-S) napravljena je *in vitro* analiza transkripcije/translacije na ekstraktu pšenične klice te je ustanovljeno da DON-3-sulfat ne pokazuje nikakve znakove toksičnosti, dok DON-15-S djeluje toksično, ali 44 puta manje nego DON (Warth i sur., 2015). A kako bi usporedili toksičnost DON-a, DOM-1, DOM-3-S i deepoksi-deoksinivalenol-15-sulfata (DOM-15-S) *in vitro* analiza transkripcije/translacije je odrađena na ribosomima sisavaca. DOM-3-sulfat je četiri puta manje toksičan od DOM-1 i za skoro 2000 puta manje toksičan od DON-a. Slično tome je i DOM-15-sulfat pokazao 3,4 puta manju toksičnost od DOM-1 i oko 1700 puta manju toksičnost od DON-a. Ti podaci potvrđuju da de-epoksidacija DON-a dovodi do nastanka manje toksičnih metabolita i da je sulfatacija detoksifikacijski mehanizam, slično kao glukozilacija kod biljaka. Zbog ovakvog metabolizma, perad je značajno otpornija na štetno djelovanje DON-a od ostalih vrsta (Schwartz-Zimmermann i sur., 2015).

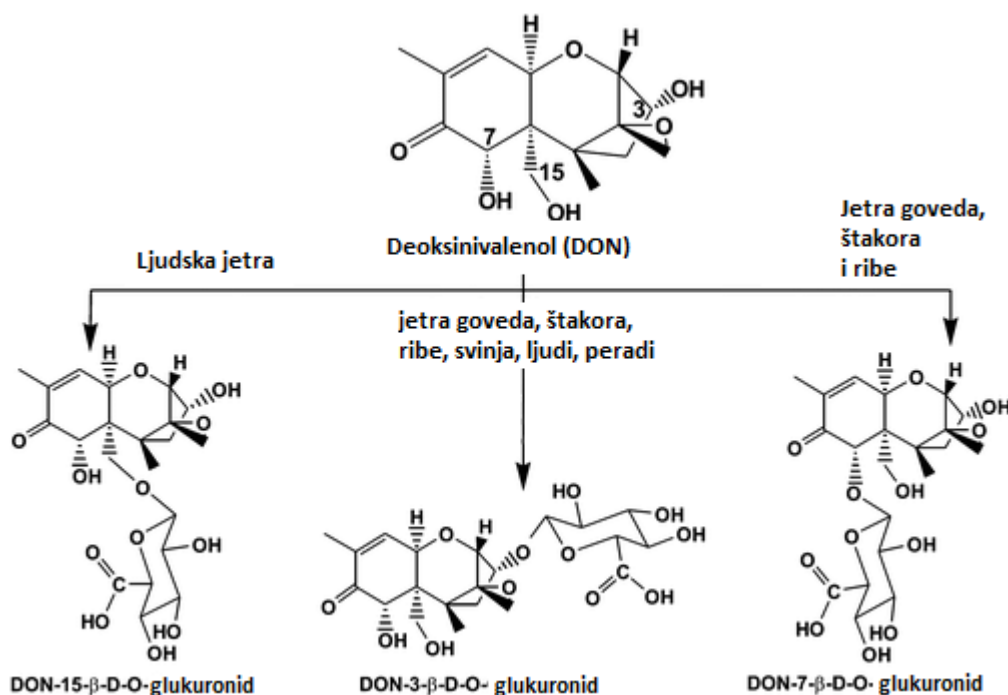


**Slika 5** Metabolizam DON-a kod životinja (Wu i sur., 2010)

Jedno od ranijih istraživanja na **ljudima** provedeno je tako da su uzorci ljudskog fecesa inkubirani kroz 48 sati uz 3-Ac-DON bez prisustva zraka. Tijekom inkubacije došlo je do deacetilacije u DON. U usporedbi sa sličnim istraživanjima na štakorima, miševima i svinjama, nisu detektirani de-epoksidni metaboliti što je upućivalo na to da ljudi nemaju crijevnu mikrobiotu potrebnu za prevođenje DON-a u njegov manje toksični oblik DOM-1, iako je u urinu Francuskih farmjera pronađen DOM-1, vjerojatno zbog prelaska crijevne mikroflore iz radne okoline (Wu i sur., 2010; Turner i sur., 2010a).

Već je poznato da trihoteceni u visokim količinama mogu izazvati akutno trovanje jer DON inhibira sintezu proteina i modulira imuni odgovor, ali njegovo uzrokovanje kroničnih bolesti kod ljudi još nije razjašnjeno pa je potrebno provesti dodatna epidemiološka istraživanja. Zbog toksičnog utjecaja su uvedene maksimalne tolerirane dnevne količine, ali DON-3-glukozid (DON-3-Glc) još nije uveden u zakonodavstvo zbog premalo informacija o pojavnosti i toksičnosti iako je na štakorima i svinjama te u *in vitro* istraživanjima dokazano da se taj metabolit može hidrolizirati u prekursorski toksin DON. Česta istraživanja na životinjama tijekom 1980-ih su pokazala značajne razlike u izlučivanju urinom i glukuronidaciji među vrstama (Warth i sur., 2013). Ta razlika je nedavno istražena u *in vitro* uvjetima jetrenog metabolizma ljudi i šest vrsta životinja koristeći mješavinu jetrenih mikrosoma. Ustanovljeno je da i ljudi i životinje nakon apsorpcije DON prevode u tri različita glukuronida pomoću jetrenih mikrosoma, ali u različitim koncentracijama. Aktivnost jetrenih mikrosoma kod preživača je  $525 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , kod štakora je  $80 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , a kod ljudi je najniža i iznosi 0,8 do  $2,2 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Različiti produkti glukuronidacije kod različitih vrsta su prikazani na **Slici 6** (Maul i sur., 2012).





**Slika 6** Razlike u glukuronidaciji kod različitih vrsta (prilagođeno iz Maul i sur., 2012)

Koncentracija DON-a u urinu je praćena nakon inkubacije  $\beta$ -glukuronidazom na uzorcima ženskih osoba iz regije Kine za koje se smatralo da je visoko rizično za rak jednjaka i izloženost DON-u te iz regije koja je imala nizak rizik raka. Kao biomarker izloženosti je predložen ukupan DON (DON + DON-glukuronidi) jer se koncentracija DON-a povećavala nakon tretiranja  $\beta$ -glukuronidazom što je potvrdilo da i kod ljudi postoje glukuronidi DON-a. U rizičnoj regiji je izloženost bila u rasponu od 14 do 94 ng mL<sup>-1</sup>, a u nisko rizičnoj između 4 i 18 ng mL<sup>-1</sup> (Meky i sur., 2003; Lou i sur., 1990).

Turner i sur. (2008a) su proveli istraživanje na 25 zdravih ispitanika koji su tijekom prva dva dana jeli uobičajenu hranu, a sljedeća četiri dana, u restriktivnoj fazi, hranu u kojoj se ne bi trebao nalaziti DON. Trećeg dana (prvi dan intervencijske prehrane) je prikupljen prvi jutarnji urin kako bi se prikazao unos DON-a u prethodna dva dana, a sedmog dana je prikupljen prvi jutarnji urin kako bi se prikazalo koliko su se ispitanici pridržavali plana prehrane. Uzorci urina su inkubirani sa <sup>13</sup>C DON-om kao internim standardom preko noći sa  $\beta$ -glukuronidazom da bi se procijenio ukupni DON. Budući da se koristio prvi jutarnji urin, završna koncentracija DON-a je preračunata kao ng DON-a po mg<sup>-1</sup> kreatinina (ng mg<sup>-1</sup>). Tijekom uobičajene prehrane, kod svih ispitanika je detektiran urinarni DON u koncentraciji od 10,8 ng mL<sup>-1</sup> (raspon 0,7-61,3), a tijekom restriktivne prehrane je samo kod nekih detektiran (36%) i to u koncentraciji od 1,0 ng mL<sup>-1</sup> (raspon 0-8,4).

Iste godine je uspoređena stopa izlučivanja 24-satnog urinarnog DON-a s unosom žitarica. Ispitanici su smješteni u kategorije u ovisnosti o unosu žitarica: niski (prosječno 107 g žitarica dan<sup>-1</sup>; raspon 88-125), srednji (prosječno 179 g dan<sup>-1</sup>; raspon 162-195) i visoki unos (prosječno 300 g dan<sup>-1</sup>; raspon 276-325) sa 100 ispitanika u svakoj kategoriji. Nakon hidrolize  $\beta$ -glukuronidazom, pomoću tekućinske kromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), je određen ukupni DON koji je detektiran u 296 od 300 (98,7%) uzoraka urina. Iako je kruh od cjelovitih žitarica najviše utjecao na koncentracije DON-a u urinu, bijeli kruh se konzumira češće pa je on značajniji (Turner i sur., 2008b).

Jedno od značajnijih istraživanja su proveli Turner i sur. (2011) na 34 ispitanika iz Velike Britanije koristeći ukupni DON (slobodni DON + DON-glukuronidi) za usporedbu sa slobodnim DON-om i DOM-1. DOM-1 je pronađen kod samo jednog ispitanika i činio je otprilike 1% ukupnog DON-a, a kod još 4 se pik preklapao sa standardnom DOM-1, ali je bio ispod limita kvantifikacije. Ljudi ne posjeduju prikladnu mikrobiotu koja bi imala de-epoksidacijsku aktivnost (osim ako nije preuzeta iz okoline kao u slučaju francuskih farmera). Slobodni DON je izlučen u 68% uzoraka, činio je oko 9% ukupnog DON-a, a ostatak (91%) su bili glukuronidi. Uridin difosfat glukuronoziltransferaza (UGT) sudjeluje u ciklusu glukuronidacije pa bi bilo poželjno ispitati postoje li razlike u glukuronidaciji ako su prisutne genetske mutacije tog enzima jer stopa glukuronidacije nije bila povezana s količinom unesenog DON-a (Turner i sur., 2011).

Warth i sur. (2013) su istraživanje proširili na 8 dana tokom kojih su pratili promjene koncentracije DON-a i DON-glukuronida što je prikazano u **Tablici 5**. Istraživanjem je obuhvaćen samo jedan ispitanik koji se pridržavao pravila prehrane, tako da je u prva dva dana jeo samo namirnice bez DON-a (riža, mliječni proizvodi, voće i povrće) kako bi se iz organizma izlučio mogući zaostali kontaminant. Zatim je tokom četiri dana jeo namirnice kontaminirane DON-om, s jednakom veličinom obroka i kontaminacijom DON-om u isto vrijeme. Četiri dana intervencijske prehrane uključivala su konzumaciju žitarica s pšeničnim mekinjama, kukuruzne kaše i brašna, kruha, piva i kokica, a nakon toga je opet dva dana konzumirao namirnice bez DON-a. Kroz četiri intervencijska dana, koncentracije DON-a su bile slične što je upućivalo da se metabolizam ne razlikuje previše iz dana u dan. Ukupni DON je izlučen stopom od 68%, dok je u Turnerovim istraživanjima stopa bila 72%, ali on je analizirao prvi jutarnji urin koji je koncentriraniji, te je noćni metabolizam nešto drugačiji. Također je prvi dan intervencijske

prehrane (treći dan) stopa izlučivanja bila niža (60%) u odnosu na druga dva intervencijska dana (četvrti dan 69%, peti dan 73%) zbog prelaska na takvu prehranu pa je i prosjek niži. Nakon prelaska sa intervencijske na redukcijsku prehranu (sedmi dan) u urinu je zaostalo samo malo DON-15-GlcA, a DON i DON-3-GlcA su bili ispod limita detekcije čime je potvrđeno da se DON brzo metabolizira unutar 24 sata. 24-satni urin je imao skoro duplo manje koncentracije DON-a od jutarnjeg urina te je dokazano da je eliminacija DON-a moguća unutar dva dana. Stopa glukuronidacije je bila 76%, a u radu Turner i sur. (2011) je bila 91%, ali se taj rezultat može objasniti višim koncentracijama DON-a unesenih prehranom u istraživanju Wartha i sur. (2013). Odnos DON-15-GlcA i DON-3-GlcA je bio 3:1. Također je pronađen treći glukuronid, deoksinivalenol 8-O-β-d-glukuronid (DON-8-GlcA), ali u preniskim koncentracijama da bi bio kvantificiran (Warth i sur., 2013). Uhlig i sur. (2013) su otkrili strukturu ovog glukuronida promatrajući NMR spektar glukuronida nastalih nakon inkubacije u mikrosomima pomoću jetrenih enzima, a prije ove potvrde smatralo se da je riječ o DON-7-GlcA. Također su se pratili DON-3-Glc i 3-Ac-DON da se utvrdi dolazi li do hidrolize u DON, ali nisu pronađeni ili zbog niske koncentracije u namirnicama ili zato što je stvarno došlo do hidrolize kao što je slučaj sa svinjama i štakorima (Warth i sur., 2013).

**Tablica 5** Koncentracija deoksinivalenola i njegovih glukuronida u 24-satnom urinu te stopa ekskrecije i glukuronidacije (prilagođeno iz Warth i sur., 2013)

Dan	Unos DON-a (μg dan <sup>-1</sup> )	DON (μg L <sup>-1</sup> )	DON-3-GlcA (μg L <sup>-1</sup> )	DON-15-GlcA (μg L <sup>-1</sup> )	Σ ukupnog DON-a (μg L <sup>-1</sup> )	Izlučivan je urina (L)	Σukupni izlučeni DON (μg dan <sup>-1</sup> )	Stopa izlučivanja (%)	Stopa konjugacije (%)
1.	-	<LOD	<LOD	3	3	2,20	6	-	-
2.	-	<LOD	<LOD	<LOD	-	1,80	-	-	-
3.	138	8	9	21	38	2,17	82	60	80
4.	138	10	7	18	35	2,73	96	69	72
5.	138	11	8	25	45	2,25	101	73	75
6.	138	9	7	23	39	2,54	98	71	77
7.	-	<LOD	<LOD	5	5	2,42	11	-	-
8.	-	<LOD	<LOD	<LOD	-	1,56	-	-	-
Prosjek	138	9	8	22	39	2,42	94	68	76

### 2.1.3 Biomarkeri izloženosti

Kako bi se razumjeli utjecaji DON-a na zdravlje, nužno je moći točno odrediti unos na individualnom nivou. Pronalaženje optimalnih biomarkera je nužno za procjenu bioraspoloživosti mikotoksina i točniju procjenu rizika. Procjena izloženosti toksinima iz hrane je tradicionalno značila mjerenje koncentracije kontaminacije u namirnici u kombinaciji s

procjenom unosa. Budući da žitarice nisu homogeno kontaminirane, bilo je nemoguće precizno procijeniti kontaminaciju DON-om na individualnoj razini i zbog toga je predloženo pronalaženje prikladnog biomarkera izloženosti. Na osnovi poznavanja apsorpcije i ekskrecije DON-a kod životinja, predloženo je razvijanje metoda za analizu biomarkera iz urina zbog visokog nivoa prijelaza DON-a i relativno jednostavnog prikupljanja urina. Prvi jutarnji urin je analiziran kako bi se vidio unos u prethodnih 24–48 sati, koncentracija DON-a u  $\text{ng mL}^{-1}$  je podešena prema koncentraciji kreatinina u  $\text{mg mL}^{-1}$ , a rezultati su izraženi u  $\text{ng DON mg}^{-1}$  kreatinina ( $\text{ng mg}^{-1}$ ) (Turner i sur., 2008a).

Meky i sur. su provodili istraživanja na štakorima i ljudima kojima su dokazali da se DON brzo metabolizira u glukuronidne konjugate koji mogu poslužiti kao biomarkeri izloženosti DON-u. DON-GlcA su glavni netoksični metaboliti DON-a pronađeni u urinu, a budući da njihove standarde nisu imali, razvili su novu metodu kojom je moguće primijeniti kombinirano određivanje nemetaboliziranog DON-a i DON-GlcA nakon hidrolize  $\beta$ -glukuronidazom čime se dobije vrijednost ukupnog DON-a (Meky i sur., 2003). Ta se analitička metoda sastoji od imunoafinitetnog prečišćavanja nakon hidrolize te je kasnije modificirana tako da uključuje DON obilježen sa  $^{13}\text{C}$  kao interni standard. Turner i sur. (2008, 2010b, 2011) su metodu u tom obliku koristili za nekoliko studija u Velikoj Britaniji. Istraživanjima na uzorcima humanog urina kod ljudi izloženima hranom kontaminiranom DON-om pronađeno je da su svi uzorci sadržavali DON-GlcA te je 68% uzoraka sadržavalo i DON i DON-GlcA (Turner i sur., 2008a). Do nedavno je u urinu ljudi otkriven samo DON i DON-GlcA, ali se nije znalo o kojem je izomeru riječ. Sintetiziran je DON-3-GlcA jer se pretpostavljalo da se u ljudskom urinu nalazi samo jedan glukuronid i da je riječ o upravo DON-3-GlcA. Nakon optimiziranja metode na rad sa UHPLC-om (ultra visokodjelotvorna/visokotlačna tekućinska kromatografija) uz DON-3-GlcA je otkriven još jedan pik, a nakon tretiranja  $\beta$ -glukuronidazom na kromatogramu ga nije bilo pa je zaključeno je da je riječ o drugom glukuronidnom izomeru. Za potrebe potvrde je sintetiziran i DON-15-GlcA. Glukuronidi su identificirani, ali i kvantificirani te je od ukupnih glukuronida DON-a 73% (69-76%) bio DON-15-GlcA, a 27% (24-31%) je bio DON-3-GlcA. Korištenjem standarda metabolita pojednostavljuje se metoda i skraćuje vrijeme koje bi se potrošilo na pročišćavanje uzoraka i enzimatsku hidrolizu  $\beta$ -glukuronidazom (Warth i sur., 2012a). Ako je poznat odnos slobodnog DON-a i njegovih glukuronida, može se procijeniti osjetljivost prema DON-u na individualnoj razini i smetnje od drugih prehrambenih metabolita

ili lijekova koji se natječu s DON-om za detoksifikaciju. Osim ova dva istraživanja konjugata, nedavna *in vitro* istraživanja su otkrila prisutnost trećeg DON-GlcA, za koji se prvo smatralo da je DON-7-GlcA, ali je ipak riječ o DON-8-GlcA (Maul i sur., 2012; Šarkanj i sur., 2013). Osim glukuronida, kod ljudi još postoje i sulfati, ali su manje zastupljeni (Warth i sur., 2016).

Iako je DOM-1 prikladan kao biomarker izloženosti deoksinivalenolu kod životinja, naročito preživača, nije prikladan kao biomarker kod ljudi jer ga se u urinu ne može detektirati ili se detektira u jako niskim koncentracijama. Turner i sur. (2011) su ga pronašli i kvantificirali kod jednog ispitanika i predstavljao je 1% od ukupnog slobodnog DON-a i DON-GlcA, a kod još četvero ispitanika je detektiran, ali nije mogao biti kvantificiran. Od 22 ispitanika iz Velike Britanije niti jedan nije imao DOM-1 u urinu (Turner i sur., 2011). U istraživanju na Francuskoj populaciji su pronašli DOM-1 kod 34% ispitanika koji su većinom bili stočari. To otkriće ukazuje na mogućnost adaptacije mikrobiote tih ispitanika na de-epoksidacijsku aktivnost, ali i dalje se DOM-1 (niti njegov glukuronid) ne smatraju prikladnim biomarkerima jer nisu značajni detoksifikacijski metaboliti kod ljudi (Turner i sur., 2010a).

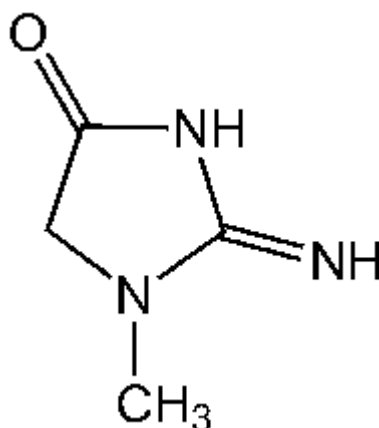
Dostupnost biomarkera omogućava istraživanje utjecaja DON-a u populaciji djece i vegetarijanaca koji su najizloženiji. Buduće procjene učinaka na zdravlje će zahtijevati točnije mjerenje izloženosti i učinka koje će moći biti moguće ako se koriste prikladni biomarkeri. Glukuronidi DON-a su pronađeni i u tkivu i izlučevinama životinja, pa su prikladni za korištenje kao biomarkeri izloženosti ljudske populacije. Odrasle osobe iz Velike Britanije su sudjelovale u istraživanju između povezanosti unosa konzumacijom žitarica i ekskrecije 24-satnim urinom. Od 300 uzoraka urina, u 98,7% je detektiran DON. Neke osobe su prekoračile i maksimalnu TDI (prihvatljivu dnevnu dozu) od  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  tjelesne mase. Izbjegavajući hranu na osnovi žitarica u prehrani, moguće je značajno smanjiti izloženost kontaminantima (Pestka, 2010; Turner i sur., 2008a).

#### 2.1.4 Kreatinin u urinu

Kreatinin je organski spoj koji se filtrira i izlučuje u bubrezima, a nastaje spontano pomoću ATP-a (adenozin trifosfat) iz kreatin fosfata u mišićima. Kako je mišićna masa konstantna, tako je i proizvodnja kreatinina skoro pa konstantna iz dana u dan. Kreatinin ima kemijsku formulu  $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$ , a strukturna formula je prikazana na **Slici 7** (Alfa Aesar, 2016). Kreatinin je

najkorišteniji marker za procjenu ekskrecije, dok na kreatinin iz seruma utječu parametri kao što su dob, spol, mišićna masa i prehrana. Kreatinin ima molekulsku masu  $113 \text{ g mol}^{-1}$  i on se proizvodi relativno konstantnom brzinom, slobodno se filtrira u glomerularnoj membrani i aktivno izlučuje u tubule bubrega. Ako je smanjena funkcija bubrega, tubularna sekrecija kreatinina se povećava (Purde i sur., 2016). Korištenje „koeficijenta kreatinina“, koji izražavaju količinu (u miligramima po kilogramu tjelesne mase) kreatinina izlučenog u 24 sata od strane zdrave osobe je temeljeno na pretpostavci da je količina kreatinina povezana s tjelesnom težinom. Međutim, urinarni kreatinin je bolje povezan s mišićnom masom, nego tjelesnom jer je uočeno da muškarci imaju veće vrijednosti kreatinina na istu tjelesnu masu, a veću mišićnu masu. Za očekivati je da pretile osobe imaju niže koeficijente kreatinina od vitkih osoba. Proizvodnja kreatinina malo varira u ovisnosti o količini ili vrsti prehrane, na nju ne utječe količina nastalog urina te se blago povisuje fizičkom aktivnosti. Točnost 24-satnog prikupljanja urina se uobičajeno provjerava određujući količinu kreatinina jer su razlike u njegovom dnevnom izlučivanju male, za jednu osobu je razlika do 10%, a između osoba je razlika najviše do 29%. Ta razlika dolazi od toga što tubuli izlučuju manju količinu zadržanog kreatinina (Narayanan i Appleton, 1980).

Klirens kreatinina ( $\text{mL min}^{-1}$ ) se izračunava prema formuli: (koncentracija u urinu/koncentracija u serumu) x volumen urina ( $\text{mL min}^{-1}$ ) x (1,73/ površina tijela ispitanika), gdje je 1,73 prosječna površina tijela u kvadratnim metrima ( $\text{m}^2$ ). Površina tijela je u korelaciji s veličinom bubrega. Klirens kreatinina i uree je obično konstantan kada je izlučivanje urina normalno. Omjer klirensa uree i klirensa kreatinina je oko 0,60, a može varirati od 0,4 do 1,10 (Narayanan i Appleton, 1980). Kreatinin iz 24-satnog urina se smatra standardnom analizom za procjenu bubrežne funkcije. Urinarni kreatinin služi kako bi se koncentracija DON-a iz  $\text{ng mL}^{-1}$  urina preračunala na  $\text{ng mg}^{-1}$  kreatinina (Quareshi i sur., 2015). Time se rezultati koncentracije normaliziraju zbog razrijeđenosti urina (ukoliko je osoba dehidrirana, koncentracija svih metabolita je viša zbog manje izlučene vode) (Warth i sur., 2013).

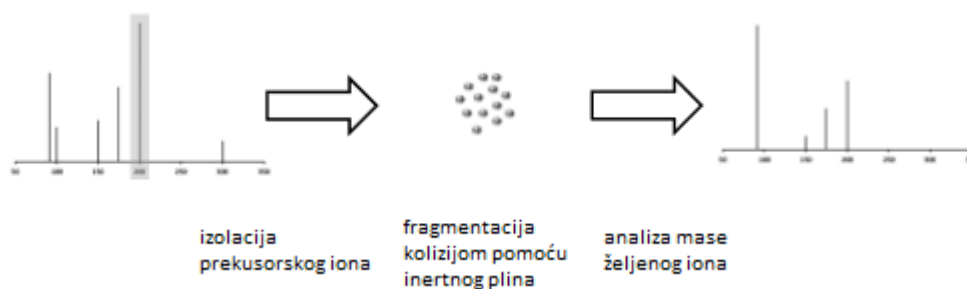


**Slika 7** Strukturna formula kreatinina (Alfa Aesar, 2016)

## 2.2 UHPLC-ESI-MS/MS

Spajanjem (U)HPLC ((ultra)visokodjelotvorna/visokotlačna tekućinska kromatografija) i MS (masena spektrometrija) štedi se vrijeme te je olakšano detektiranje kompleksnijih spojeva (Taleuzzaman i sur., 2015). LC-MS sustavi omogućuju analizu spojeva koji se ne mogu analizirati plinskom kromatografijom vezanom za spektrometar masa te analizu termički nestabilnih analita (Budimir, 2016). Kod UHPLC-MS/MS-a, uređaji i programi LC-a i MS-a su ukomponirani i integrirani u jedan sustav koji daje visoku selektivnost i osjetljivost. Sama kvaliteta podataka je poboljšana jer su pikovi oštiri, niži je šum, a shodno tome LOD (limit detekcije) i LOQ (limit kvantifikacije) su sniženi (Pratima i sur., 2013). Tandem MS (MS/MS) je tehnika koja uključuje dva koraka u analizi masa, bilo u kombinaciji s postupkom fragmentacije ili u kemijskoj reakciji koja uzrokuje promjenu mase ili naboja iona (Varga, 2010). Postoje različite izvedbe LC kolona za potrebe analiza različitih spojeva obzirom na njihova fizikalno-kemijska svojstva. Izbor otapala je ograničen jer mnoga do sada korištena otapala uzrokuju taloženje soli u spektrometru masa. Uređaj je također osjetljiv na onečišćenja te uspješnost LC-MS/MS analize ovisi i o prethodnoj pripremi uzoraka (Budimir, 2016).

**Slika 8** shematski prikazuje princip rada sustava u kojem se prvo prekursorski ion izolira na prvom analizatoru masa, fragmentira kolizijom pomoću inertnog plina, a dobiveni ioni izdvajaju i analiziraju u drugom masenom spektrometru (Madeira i Florêncio, 2012).



**Slika 8** Shematski prikaz rada MS/MS sustava ( prilagođeno iz Madeira i Florêncio, 2012)

### 2.2.1 UHPLC

UHPLC je separacijska tehnika nastala poboljšanjem HPLC-a čije su glavne prednosti robusnost, jednostavnost, dobra selektivnost i osjetljivost, ali je ograničena u primjeni u usporedbi s plinskom kromatografijom i kapilarnom elektroforezom. Razlog je u tome što HPLC ima niži koeficijent difuzije u tekućoj fazi što utječe i na nizak koeficijent difuzije na čvrstoj fazi. Učinkovitost se može povećati smanjujući veličinu čestica stacionarne faze ispod  $2,5\ \mu\text{m}$ . HPLC radi na tlakovima do 400 bara, a smanjenje čestica utječe na povećanje tlakova, tako da se u UHPLC-u koriste kraće kolone koje su ispunjene česticama veličine manje od  $4\ \mu\text{m}$  koje moraju biti otporne na rad na visokim tlakovima (Pratima i sur., 2013).

Prednosti UHPLC-a su mnoge: kraće vrijeme analiza, povećana osjetljivost zbog strmijih pikova, poboljšana selektivnost, manja potrošnja otapala, niža cijena analize i drugo. Nedostaci su većinom vezani uz veličinu čestica. Zbog povećanog tlaka potrebno je više održavanja, a vijek kolona je smanjen. Kolone kojima je veličina čestica manja od  $3\ \mu\text{m}$  u većini slučajeva se ne mogu regenerirati pa imaju ograničen broj korištenja te je zahtjevnija priprema uzoraka.

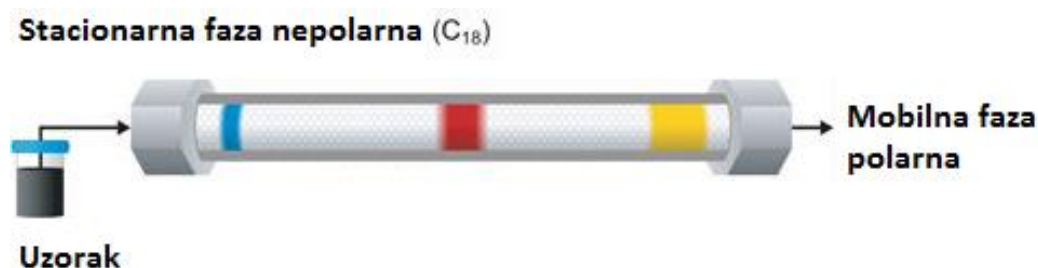
Primjenjiva je za analize prirodnih proizvoda i tradicionalnih biljnih lijekova, identifikaciju biotransformacije metabolita, proučavanje metabolomike i biokemijskih promjena koje se odvijaju u biološkim sustavima, proučavanje ADME (adsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija), bioanalize, testiranje topljivosti kod kontrole kvalitete u farmaceutskoj industriji, razumijevanje promjene spojeva kroz vrijeme pod različitim vanjskim utjecajima. Metoda se također koristi kod proizvodnje, osiguranja kvalitete i kontrole kvalitete, za identifikaciju, provjeru čistoće, razvoj novih metoda, validaciju, sigurnost i učinkovitost što je posebno bitno



u proizvodnji lijekova kod kojih se zahtijeva čistoća sirovina te konačnog proizvoda (Pratima i sur., 2013).

### Principi rada UHPLC-a

Tekućinska kromatografija (LC) je analitička tehnika kojom je moguće razdvojiti nekoliko komponenti iz uzorka. Razdvajanje se zasniva na interakciji analita s različitim kemijskim i fizičkim svojstvima između stacionarne faze (kolone) i mobilne faze (eluenta). Postoje različiti tipovi kromatografije u ovisnosti o svojstvima dviju faza kao što su: kromatografija normalnih faza (polarna stacionarna faza, nepolarna mobilna faza), kromatografija obrnutih faza/reverzno fazna kromatografija (nepolarna stacionarna faza, polarna mobilna faza na **Slici 9**) koje spadaju u razdjelnu kromatografiju, ionsko-izmjenjivačka kromatografija (privlačenje otopljenih iona iz mobilne faze prema suprotno nabijenoj stacionarnoj fazi), kromatografija isključenjem (razdvajanje na osnovi veličine čestice, ali i oblika te naboja), adsorpcijska (razdvajanje na temelju afiniteta analita prema površini stacionarne faze) te afinitetna kromatografija (razdvajanje analita pomoću interakcije s ligandom vezanim na stacionarnu fazu). Postoji veliki raspon stacionarnih i mobilnih faza za optimalno razdvajanje u analitičkim i biokemijskim analizama (Varga, 2010).



**Slika 9** Kolona za reverzno-faznu kromatografiju (prilagođeno iz Waters, 2016)

Princip rada UHPLC-a je isti kao i za HPLC, ali je izvedba nešto drugačija. Glavna razlika je veličina čestica stacionarne faze koje su manje od 3  $\mu\text{m}$ . Zbog sitnijih čestica razvijaju se veći tlakovi, a kako bi se oni smanjili potrebno je povišiti temperaturu što uzrokuje smanjenje viskoznosti mobilne faze te ubrzanje protoka mobilne faze. U **Tablici 6** su prikazane razlike između HPLC-a i UHPLC-a (Taleuzzaman i sur., 2015).

**Tablica 6** Razlike između HPLC-a i UHPLC-a (prilagođeno iz Taleuzzaman i sur., 2015).

Karakteristika	HPLC	UHPLC
Veličina čestica	3 do 5 $\mu\text{m}$	manje od 2 $\mu\text{m}$
Maksimalni radni tlak	35 do 40 MPa	103,5 MPa
Dimenzije kolone	150 x 3,2 mm	150 x 2,1 mm
Temperatura kolone	30°C	65°C
Volumen injektiranja	5 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$

Otapala ne smiju sadržavati plinove prije početka korištenja, zbog čega se koristi protočni degazer. Crpka mora omogućavati konstantan, precizan i stabilan protok eluenta (mobilne faze). Često se koristi autosampler kako bi se smanjio opseg posla i osigurala preciznost u injektiranju uzorka u uređaj. Temperatura kolone i pretkolone je kontrolirana termostatom. Sam kraj kolone je povezan s masenim spektrometrom (ili drugim detektorom) i odvodom za otpad (Varga, 2010).

Kod pripreme uzorka se mogu koristiti prečišćavanje ili „razrijedi i injektiraj“ („dilute and shoot“) princip. Kada se koristi „razrijedi i injektiraj“ tehnika, uzorci se jednostavno razrijede i ubrizgaju u LC-MS/MS uređaj. Problem nastaje ako je uzorak jako onečišćen što može oštetiti uređaj, zaustaviti rad kolone te dovesti do smanjene osjetljivosti. U tom slučaju se uređaj mora isključiti, a kolona očistiti. Kod prečišćavanja je cilj ukloniti supstance iz matriksa uzorka koje bi mogle stupiti u interakciju s kolonom, a koriste se SPE (engl. – Solid phase extraction, Ekstrakcija na čvrstoj fazi) kolone. Problem je u tome što svaki korak prečišćavanja dovodi do novih izvora mjerne nesigurnosti i pogrešaka, a nije ga moguće koristiti kada se mjere analiti s izrazito različitim svojstvima (Varga, 2010).

### 2.2.2 MS

MS (Masena spektrometrija) je analitička tehnika u kemiji, biokemiji, farmaciji, medicini i mnogim drugim srodnim granama znanosti. Korištena je u bazama podataka za sekvencioniranje biomolekula te pomaže u istraživanju stanica ili objekata iz svemira. Na masenu spektroskopiju se oslanjaju kod pronalaženja struktura nepoznatih spojeva, ekoloških i forenzičkih analiza, kontrole kvalitete lijekova, hrane i polimera. Bez obzira koji je analitički

problem u pitanju, masena spektrometrija nastoji identificirati spoj iz molekularne ili atomske mase njegovih sastavnih dijelova. Informacija dobivena iz mase može biti dovoljna za identifikaciju elemenata i određivanje molekularne formule analita, ali za apsolutnu potvrdu potrebno je napraviti dodatne NMR studije. Izotopi pomažu u određivanju koji elementi doprinose takvoj formuli i procjeni broja atoma pojedinog elementa. Fragmentacija iona može dati informacije o ionskoj strukturi. MS određuje (prosječni) broj i redoslijed sastavnih dijelova makromolekula (Gross, 2004).

MS je analitička metoda temeljena na analiziranju molekula prema omjeru masa i naboja ( $m/z$ ). Molekule se prevode u ione koji se mogu fragmentirati na druge ionske fragmente. Sam uređaj se sastoji od ionskog izvora gdje nastaju ioni, analizatora masa koji nastale ione razdvaja prema omjeru  $m/z$ , detektora i sustava za obradu podataka. Rezultati se prikazuju grafički spektrom masa koji prikazuje ovisnost relativnog intenziteta iona o njihovom  $m/z$  omjeru (Budimir, 2016).

U masenom spektrometru, analiti su prvo upareni i ionizirani. Dobiveni ioni zatim ubrzavaju prema analizatoru masa u kojem se vrši njihova separacija na osnovu  $m/z$  omjera pod utjecajem elektromagnetskog polja. Ioni koji napuste analizator masa se detektiraju, a dobivena informacija se snima (Varga, 2010). Kao potvrdu identifikacije analita koristi se omjer kvantifiera i kvalifiera koji uvijek mora biti konstantan uz dopušteno odstupanje do 40% kod niskih koncentracija ispod ppb razine. Kvantifier je ona tranzicija koja daje najbolji omjer signala i šuma te najveći odziv. Kvalifier je drugi fragment kojim radimo kvalitativnu potvrdu da je riječ o analitu koji tražimo (Gross, 2004).

Ukoliko se MS koristi bez prethodne kromatografije (kod razvoja metode npr.), uzorak se može injektirati direktno kroz crpku koja će omogućiti konstantan protok otopine (Varga, 2010).

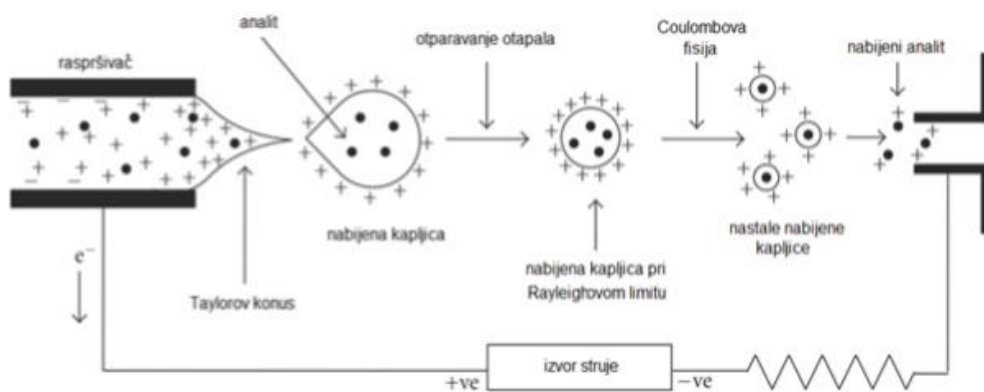
### 2.2.3 ESI ionizacija

U vezanim LC-MS sustavima najčešći oblik ionizacije molekula je ESI (ionizacija elektroraspršenjem). Pomoći ESI moguće je prevesti masivne, termolabilne i nehlapljive molekule u plinsku fazu kako bi se mogle analizirati u spektrometru masa. Zbog toga mu je glavna primjena u analizi bioloških molekula koje je teško prevesti u plinovito stanje i ionizirati. Ionizacija je pozitivna ili negativna, što ovisi o naponu na kapilari i elektrodi, ali i o svojstvima

molekule koju želimo ionizirati. Optimalna temperatura je iznad 100 °C, pri atmosferskom tlaku i u struji dušika (Budimir, 2016).

Ionizacijski potencijal (IP), također poznat kao energija ionizacije, je energija potrebna da bi se stvorili ioni. Ionizacijske tehnike se mogu podijeliti na jake i slabe ionizacije. U jakim ionizacijskim tehnikama nastaju ioni, ali i analiti se fragmentiraju zbog primijenjene jače energije (takozvana „in-source“ fragmentacija). U slabim ionizacijskim tehnikama je fragmentacija manja pa je jednostavnije identificirati molekulsku masu traženog analita. API (ionizacija kod atmosferskog tlaka) je slaba ionizacijska metoda i bila je prva tehnika koja je omogućavala povezivanje tekućinske kromatografije s masenim analizatorom. ESI je vodeća API tehnika koja se koristi za  $m/z$  omjere od 3000.

Sustav za unošenje uzorka se sastoji od komore na koju je vrh igle postavljen okomito i grijača pored igle. Vrh igle za injektiranje mora biti precizno postavljen jer i mali odmak može rezultirati značajno smanjenom osjetljivošću i utjecati na razliku u koncentraciji provedenih iona. Uzorci se unose kroz električno nabijeni vrh igle te se nebuliziraju (raspršuju u sitne kapljice) u Taylorovom konusu zagrijanim plinom iz grijača. Nastaju nabijene kapljice čija se veličina smanjuje zbog isparavanja otapala, a koncentracija analita se povećava. Rayleighov limit je stanje u kojem su sile odbojnosti veće od površinske napetosti kapljica i dolazi do raspadanja kapljica Coulombovom fisijom u puno sitnijih kapljica te na kraju ostaju samo ioni u plinskoj fazi. Ioni mogu proći kroz zastor plina i dalje kroz mali otvor u analizator, dok neutralne molekule ne bi mogle što se vidi na **Slici 10**. Između zastora plina i proreza u analizator postoji potencijal degrupiranja koji služi da bi se umanjio broj grupiranih iona iz otopine koji mogu biti vezani za analite. Ioni nastali u ESI-u ovise o polarnosti analita, otapala, modificirajućih dodataka i prisutnosti nečistoća u otapalu.



**Slika 10** Princip rada ESI sustava (prilagođeno iz Banerjee i Matumdar, 2012)

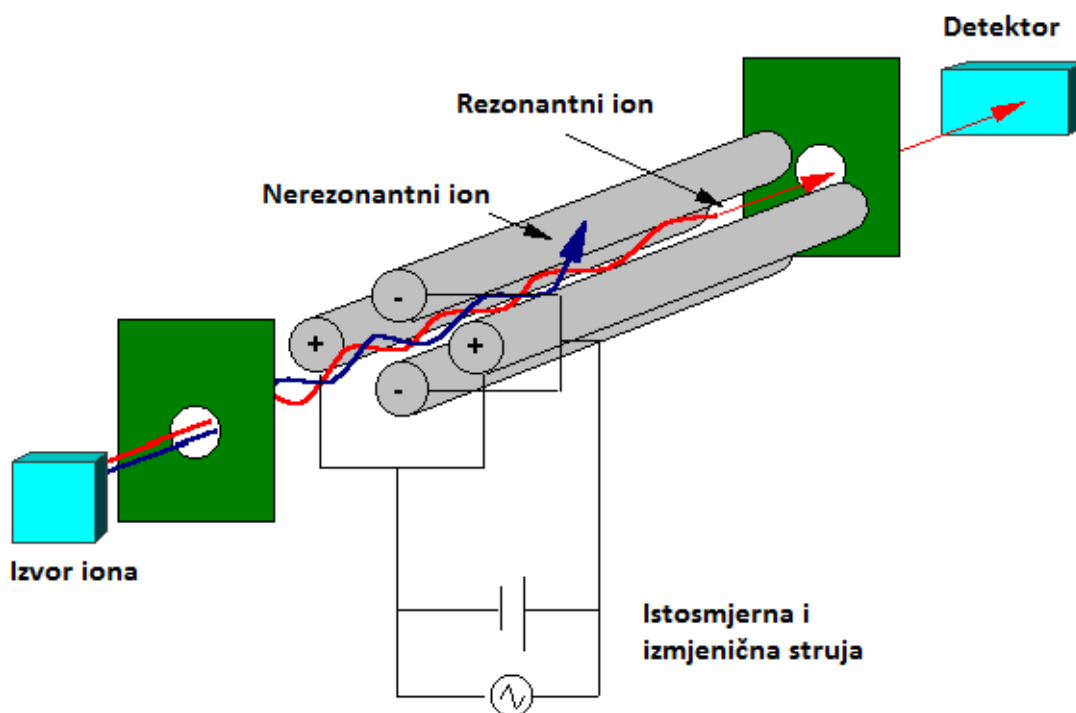
Na primjer, jednostruko i, u slučaju analita veće mase, višestruko protonirane ( $[M+H]^+$ ,  $[M+nH]^{n+}$ ) ili deprotonirane ( $[M+H]^-$ ,  $[M+nH]^{n-}$ ) molekule, kationi (kao što su  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  ili  $[M+NH_4]^+$ ) i anioni (kao što su  $[M+Ac]^-$ ,  $[M+Cl]^-$  ili  $[M+HCOO]^-$ ) su tipični. Ako su analiti ioni, može doći do promjene naboja te nastanka kationa ( $C^+$ ) i aniona ( $A^-$ ), kao i do stvaranja adukta ( $[C_n+A_{n-1}]^+$  ili  $[C_{n-1}+A_n]^-$ ) (Varga, 2010, Šarkanj, 2014).

#### 2.2.4 Princip rada trostrukog kvadrupola

Trostruki kvadrupoli mogu skenirati cijeli raspon mase (10 – 3000 Da) u desetinki sekunde i jedni su od najčešće korištenih. Svaki kvadrupol se sastoji od četiri cilindrične elektrode koje su spojene u dva para ili od elektroda oblikovanih u hiperbolu. Suprotne elektrode su povezane i istovremeno imaju isti potencijal. To znači da su dvije elektrode pozitivnog, a dvije negativnog polariteta. Ion koji kroz prorez uđe u kvadrupol je privučen prema elektrodi sa suprotnim elektronskim nabojem. Princip rada kvadrupola je temeljen na kretanju pozitivno nabijenih iona prema fokusu tijekom pozitivne polovice izmjeničnog ciklusa u odsutnosti istosmjernog napona, a prema elektrodama za vrijeme negativne polovice izmjeničnog ciklusa. Budući da se naboj periodički mijenja, dolazi do izmjeničnog privlačenja i odbijanja iona od elektroda, te ion putuje u spiralnoj putanji prema kraju kvadrupola (Varga, 2010). Ioni koji su u analizatoru imaju različite vrijednosti omjera mase i naboja pa mogu proći kroz analizator ili dotaknuti elektrode čime bi izgubili naboj i postali neutralni. Osim toga, njihovo gibanje kroz kvadrupol je određeno naponom, kutnom frekvencijom, masom, radijusom i drugim parametrima. Izmjenični potencijal može dovoljno lagane ione držati u stabilnoj putanji dalje od elektroda kako ne bi došlo do njihove neutralizacije. Određeni izmjenični napon rezultira nastankom iona iste mase (rezonantnih iona) koji imaju jednaku amplitudu kretanja kroz kvadrupol i jedino oni mogu doći do detektora jer ioni s različitim masama imaju nepravilnu putanju (**Slika 11**) (Budimir, 2016).

Prvi kvadrupol ( $Q_1$ ) odabire prekursorske ione analita koji se propušta dalje, a ostali analiti se neutraliziraju u dodiru s elektrodama. Ulazni potencijal kolizijske ćelije regulira propuštanje iona u drugi kvadrupol. Drugi kvadrupol ( $q_2$ ) djeluje kao kolizijska ćelija (CC) u kojoj kolizijski plin s tlakom od 0,1 do 0,3 Pa djeluje na ione te nastaju njihovi fragmenti. Fragmentacija iona se najčešće odvija pomoću dušika u kolizijom aktiviranoj disocijaciji. Uspostavlja se napon koji

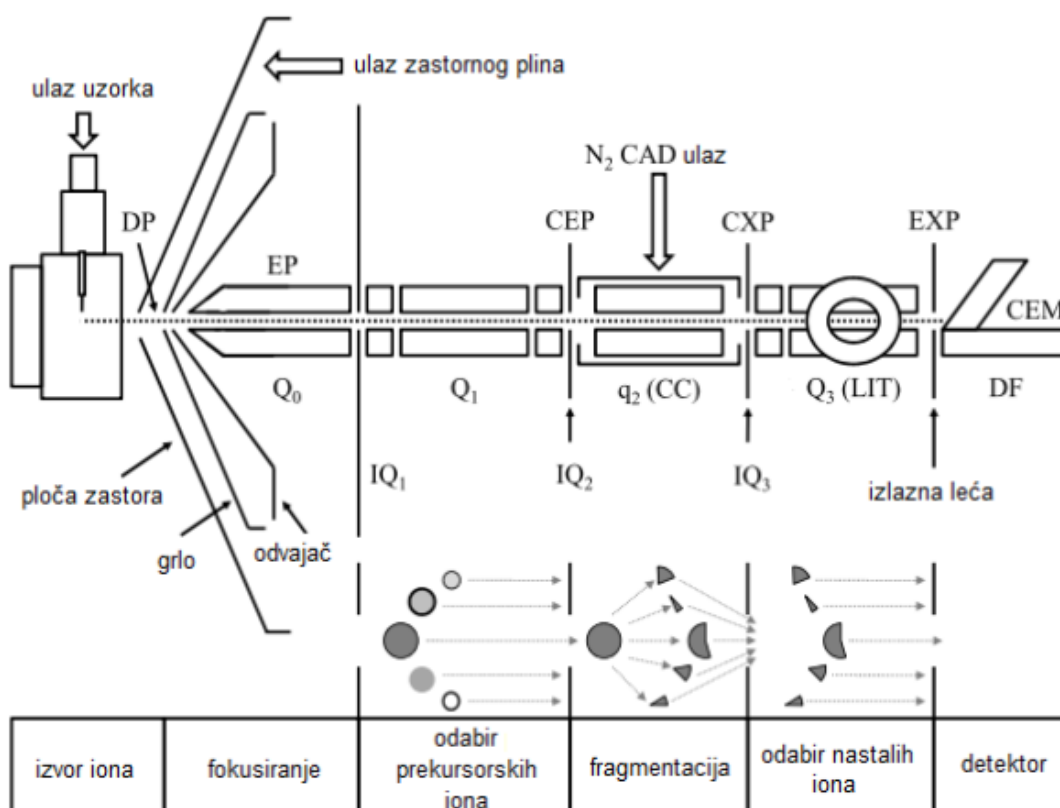
ih pokreće dalje na izlaznom dijelu kolizijske ćelije i u ovisnosti o njihovom  $m/z$  omjeru se razdvajaju u trećem kvadrupolu ( $Q_3$ ) (Varga, 2010).



**Slika 11** Shematski prikaz puta iona kroz kvadrupol (prilagođeno iz Chemicool, 2016)

Treći kvadrupol može biti različite izvedbe. Ako je MS/MS uređaj s trostrukim kvadrupolima ( $QqQ$ ), u njemu se odvajaju i usmjeravaju specifični fragmenti traženog analita.

Treći kvadrupol ( $Q_3$ ) može biti i hvatač iona (Qtrap uređaji koji imaju linearni hvatač iona (LIT) u koji se skupe svi fragmenti iz  $q_2$  što omogućuje bolju informaciju o analitu te podjednaku preciznost u kvantificiranju. U hvataču iona se dobije cijeli fragmentacijski spektar prekursorskih iona. Ioni koji prođu kroz zadnji kvadrupol udaraju po površini kontinuiranog množitelja elektrona, prelaze preko deflektora do detektora, a on te udarce broji po sekundi za određeni odnos  $m/z$  (**Slika 12** shematski prikaz rada) (Varga, 2010, Šarkanj, 2014).



**Slika 12** Princip rada MS/MS uređaja (prilagođeno iz Varga, 2010)

Trostruki kvadrupol se može koristiti u više modova za skeniranje, a neki od njih su:  $Q_1$  skeniranje,  $Q_1$  višestruko ionsko skeniranje, SRM skeniranje. MRM je oblik SRM skeniranja kod kojeg prvi kvadrupol  $Q_1$  odabire prekursorski ion analita, a  $q_2$  služi kao kolizijska ćelija gdje analit i kolizijski plin dolaze u interakciju, nastaju fragmenti koji se u  $Q_3$  odvajaju na temelju mase i naboja. U MRM modu skeniranja se podesi nekoliko  $m/z$  vrijednosti koje se skeniraju, a ne cijelo područje mase pa su rezultati dobiveni brže i preciznije. Fragmentirani ioni nastaju u ovisnosti o nekoliko čimbenika: jakosti kemijske veze, stabilnosti produkta, vremenu između nastanka iona i njegove detekcije i sl. Veze su stabilizirane induktivnim i mezomernim efektom. Induktivni efekt znači da grupe s elektron donorima djelomično neutraliziraju pozitivan naboj i dodatno stabiliziraju vezu. Mezmerni efekt je rezultat višestrukih veza koje stabiliziraju pozitivni centar. Konjugirane veze su daleko stabilnije od induktivnog efekta jer se pozitivan naboj rasprostire preko cijelog iona (Varga, 2010).

### **3 EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1 ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je utvrditi stopu izlučivanja DON-a pomoću biomarkera iz urina dobrovoljaca nakon konzumacije namirnica kontaminiranih poznatim koncentracijama DON-a i njegovih metabolita.

### 3.2 MATERIJAL, METODE I ISPITANICI

#### 3.2.1 Kemikalije i reagensi

Metanol (HPLC čistoće) i ledena octena kiselina (HPLC čistoće) su kupljene od Merck-a (Darmstadt, Njemačka), acetonitril (ACN; HPLC čistoće) od VWR (Leuven, Belgija), kreatinin od Sigmee (Schnelldorf, Njemačka). Deoksinivalenol-3-*O*-glukuronid (DON-3-GlcA) i zearalenon-14-*O*-glukuronid (ZEA-14-GlcA) su sintetizirani, a strukture su im određene nuklearnom magnetskom rezonancom. Deoksinivalenol-15-*O*-glukuronid (DON-15-GlcA) je izdvojen iz kontaminiranog uzorka ljudskog urina da bi se pomoću MS-a odredio omjer s DON-3-GlcA. Ostali standardi mikotoksina su kupljeni u Romerlabsu (Tulln, Austrija) (DON, de-epoksi-deoksinivalenol (DOM-1), nivalenol (NIV), T-2 toksin, HT-2 toksin, OTA, AFM<sub>1</sub> (Aflatoksin M1), FB<sub>1</sub> (Fumozin B<sub>1</sub>) i FB<sub>2</sub> (Fumozin B<sub>2</sub>)) te od Sigma (ZEA,  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenol ( $\alpha$ - i  $\beta$ -ZEL)). Standardi su otopljeni u čistom metanolu (DON-3-GlcA, NIV) ili u ACN-u (DON, ZEA-14-GlcA, ZEA,  $\alpha$ - i  $\beta$ -ZEL). Svi su zajedno pomiješani u „master miks“ i čuvani su na -20°C u tamnoj bočici. Pripremljena je i radna otopina u ACN-u s više standarda koja je sadržavala 10,0 mg L<sup>-1</sup> DON-a, DON-3-GlcA, DOM-1, NIV-a i T-2, 5,0 mg L<sup>-1</sup> FB<sub>1</sub> i FB<sub>2</sub>, 2,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA-14-GlcA,  $\alpha$ - i  $\beta$ -ZEL-a i T-2, 1,0 mg L<sup>-1</sup> ZEA i 0,125 mg L<sup>-1</sup> AFM<sub>1</sub> i OTA, a koja je opisana u radu Warth i sur. (2012a).

#### 3.2.2 Ispitanici

Ispitanika je bilo 49 i podijeljeni su u nekoliko kategorija (**Tablica 7**): prema dobi, visini i težini koje su služile za određivanje BMI-a i potrebne količine namirnica koje su sadržavale DON, prema mjestu stanovanja, pušači ili nepušači, laktoovovegetarijanci/vegani/svejed, primanja u kućanstvu. U kategoriji dob bile su 3 podskupine: 22 – 30 godina u kojoj je bio 21 ispitanik, 31 – 40 godina u kojoj je bilo 24 ispitanika te 41 – 52 godine u kojoj su bila 4 ispitanika. Muških ispitanika bilo je 19, a ženskih 30. Kategorija BMI se sastojala od 4 podskupine: pothranjeni kojih je bilo 4 i kojima je BMI bio manji od 18,50, normalno uhranjeni kojih je bilo 34 i kojima je BMI bio od 18,50 do 24,99, ispitanici s prekomjernom masom kojih je bilo 5 i kojima je BMI

bio od 25,00 do 29,99 te 5 ispitanika iz skupine pretilih kojima je BMI bio viši od 30,00 prema kriterijima WHO (2016). Od ispitanika, njih 15 su bili pušači, a 34 nepušači. U kategoriji prehrana bile su 3 podskupine: laktoovovegetarijanaca je bilo 5, omnivora 30 i vegana 14. Kategorija primanja je podijeljena u 4 podskupine prema uputama Hrvatske agencije za hranu: u skupini koja je imala 1000 – 3000 kn mjesečno bilo je 16 ispitanika, u skupini 3001 – 6000 kn je bio 21 ispitanik, u skupini 6001 – 9000 je bilo 5 ispitanika, a u skupini koja je primala više od 9000 je bilo 5 ispitanika. U kategoriji edukacija, 11 ispitanika je imalo završenu SSS, 32 VSS i 6 je imalo VŠS. Ispitanici su morali biti zdravi i ne koristiti lijekove koji bi mogli utjecati na rezultate. Na temelju analize DON-a odabrano je nekoliko proizvoda koje su dobrovoljci konzumirali (kruh, zobene pahuljice, pšenične posije). Ispitanici su dobili upute za prikupljanje 24-satnog urina koji je poslije korišten za analizu urinarnih biomarkera izloženosti DON-u.

Tablica 7 Upitnik

<b>Prezime i ime</b>						
<b>Dob</b>						
<b>Visina</b>						
<b>Težina</b>						
<b>Mjesto stanovanja</b>						
<b>Tip prehrane</b>	Svejed	<input type="checkbox"/>	Vegetarijanac	<input type="checkbox"/>	Vegan	<input type="checkbox"/>
<b>Pušenje</b>	Da		Ne			
	Trajanje navike u godinama:		Cigareta dnevno:			
<b>Stupanj obrazovanja</b>						
<b>Primanja po članu kućanstva</b>						
<b>Napomene</b>						

### 3.2.3 Prikupljanje urina

Prvi i drugi dan su bili priprema za intervencijsku prehranu te su ispitanici trebali isključiti unos svih namirnica i hrane na bazi žitarica (pšenica, ječam, riža, kukuruz, raž, i dr.), uključujući brašno, kruh i peciva, griz, palentu, tjesteninu, žitne pahuljice, mueslije, kekse, kolače, grickalice, pivo, čokolino, i sličnu hranu, također proizvode od soje, kao i obroke koje sadrže žitarice i proizvode u malim količinama poput jela sa zaprškom ili čokolade s keksima te zamjene za kavu. Mogli su po želji i bez količinskih ograničenja konzumirati mlijeko i mliječne proizvode, meso, jaja, voće i povrće i sva bezalkoholna i alkoholna pića osim piva. Period pripreme za prikupljanje urina započeo je ujutro nakon buđenja.

Treći dan je uključio tzv. intervencijsku prehranu pa su ispitanici trebali konzumirati namirnice koje su dostavljene prema rasporedu, a isključiti svu ostalu gore navedenu hranu na bazi žitarica i soje. Namirnice koje su konzumirali su analizirane te su ispitanici dobili točno određenu količinu namirnica koja je sadržavala točno određenu koncentraciju DON-a prema masi ispitanika. Manja (sat-dva) odstupanja od rasporeda konzumacije nisu predstavljala problem. Osim intervencijskih namirnica mogli su po želji i bez količinskih ograničenja konzumirati mlijeko i mliječne proizvode, meso, jaja, voće i povrće i sva bezalkoholna i alkoholna pića osim piva. Tijekom trećeg dana trebali su prikupljati sav urin. Prvi jutarnji urin sakupljao se u posebnu posudicu, a sve ostalo u bocu (**Slika 13**). Urin je morao biti čuvan zatvoren i u hladnjaku. Posljednji uzorak je prvi jutarnji urin četvrtog dana.



**Slika 13** Boce s prikupljenim 24-satnim urinom na kojima je oznaka ispitanika, početak i kraj prikupljanja urina

### 3.2.4 Priprema uzoraka

Nakon prikupljanja urina odvojeno je 15 mL koji su zamrznuti i čuvani na  $-20^{\circ}\text{C}$  sve do mjerenja. Za mjerenje uzorci su odmrznuti na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak je promiješan, te je 1 mL prebačen u Eppendorf epruvetu od 2 mL i centrifugiran 3 minute na  $5600 \times g$ . Od supernatanta je 100  $\mu\text{L}$  alikvota (gornjeg sloja nakon centrifuge) pomiješano s 900  $\mu\text{L}$  otopine za razrjeđivanje ( $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}=10/90$ ) te je prebačeno u viala za mjerenje, a 5  $\mu\text{L}$  razrjeđenog uzorka urina je direktno injektirano u LC-ESI-MS/MS sustav.

### 3.2.5 Analiza uzoraka urina i uvjeti rada LC-MS/MS-a

Analiza uzoraka je provedena na AB Sciex QTrap® 5500 LC-MS/MS uređaju (Foster City, CA) koji je opremljen s TurbolonSpray ionizacijom elektroraspršenjem (ESI) te UHPLC sistemom Agilent serije 1290 (Waldbronn, Njemačka). Optimalni „dilute and shoot“ pristup je opisan u radu Wartha i sur. (2012a) prema kojemu su podešeni radni uvjeti. Analiti su razdvojeni na reverzno-faznoj Atlantis® T3 koloni (3,0 x 150 mm, Waters, Wexford, Irska) s veličinom čestica od 3  $\mu\text{m}$  i pripadajućom predkolonom. Eluent A je bila ultra čista voda, a eluent B je bio ACN i oba su sadržavala 0,1% octene kiseline. Tijekom 2 minute eluent A je bio 95%, nakon čega je

postotak eluenta B povišen linearno do 30% do 10 minute. Tada je eluent B povišen na 96% do 14 minute i tako je ostalo još jednu minutu. Sljedeće 2,25 minute je kolona vraćena u ravnotežu dovodeći opet 95% eluenta A. Protok je bio  $600 \mu\text{L min}^{-1}$ . Eluent je usmjeren u maseni spektrometar (od pete do petnaeste minute) ili je odveden u otpad.

ESI-MS/MS je odrađen u SRM modu. Dvije individualne tranzicije su praćene za svaki analit, osim za DON-3-GlcA gdje su praćene tri tranzicije jer treća tranzicija ( $m/z$  471,0  $[\text{M}-\text{H}]^-$  do 441,0) omogućava razlikovanje između DON-3-GlcA i DON-15-GlcA. Prvi dio analize (5 – 10 min) je praćen u negativnom načinu rada (NIV, DON-3-GlcA, DON, DOM-1). U drugom dijelu analize (10 – 15 min) su korištena oba načina ionizacije istovremeno promjenom polarosti. Sva mjerenja su obavljena na sljedećim parametrima: temperatura izvora  $650^\circ\text{C}$ , zastor plina 30 psi (69 kPa 99,5% dušika), plin 1 izvora iona (plašt plina) 80 psi (345 kPa dušika), plin 2 izvora iona (plin za sušenje) 80 psi (345 kPa dušika), kolizijski plin (dušik). Energija ionizacije bila je - 4000 V u negativnom modu i 4000 V u pozitivnom modu.

Korištene metode su optimalne za praćenje izloženosti visokim i srednje visokim koncentracijama mikotoksina. Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ) su izračunati iz obogaćenih uzoraka urina koristeći algoritam u računalnom programu Analyst i prikazani u **Tablici 8**. Odnos signala i šuma za LOD je bio 3:1, a za LOQ je bio 10:1, a vrijednosti odgovaraju koncentraciji u urinu jer su preračunate za razrjeđenje od 1:10.

**Tablica 8** Vrijednosti LOD i LOQ za DON i njegove glukuronide

	LOD matriksa ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ matriksa ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
DON	4	13
DON-3-GlcA	6	20
DON-15-GlcA	3	11

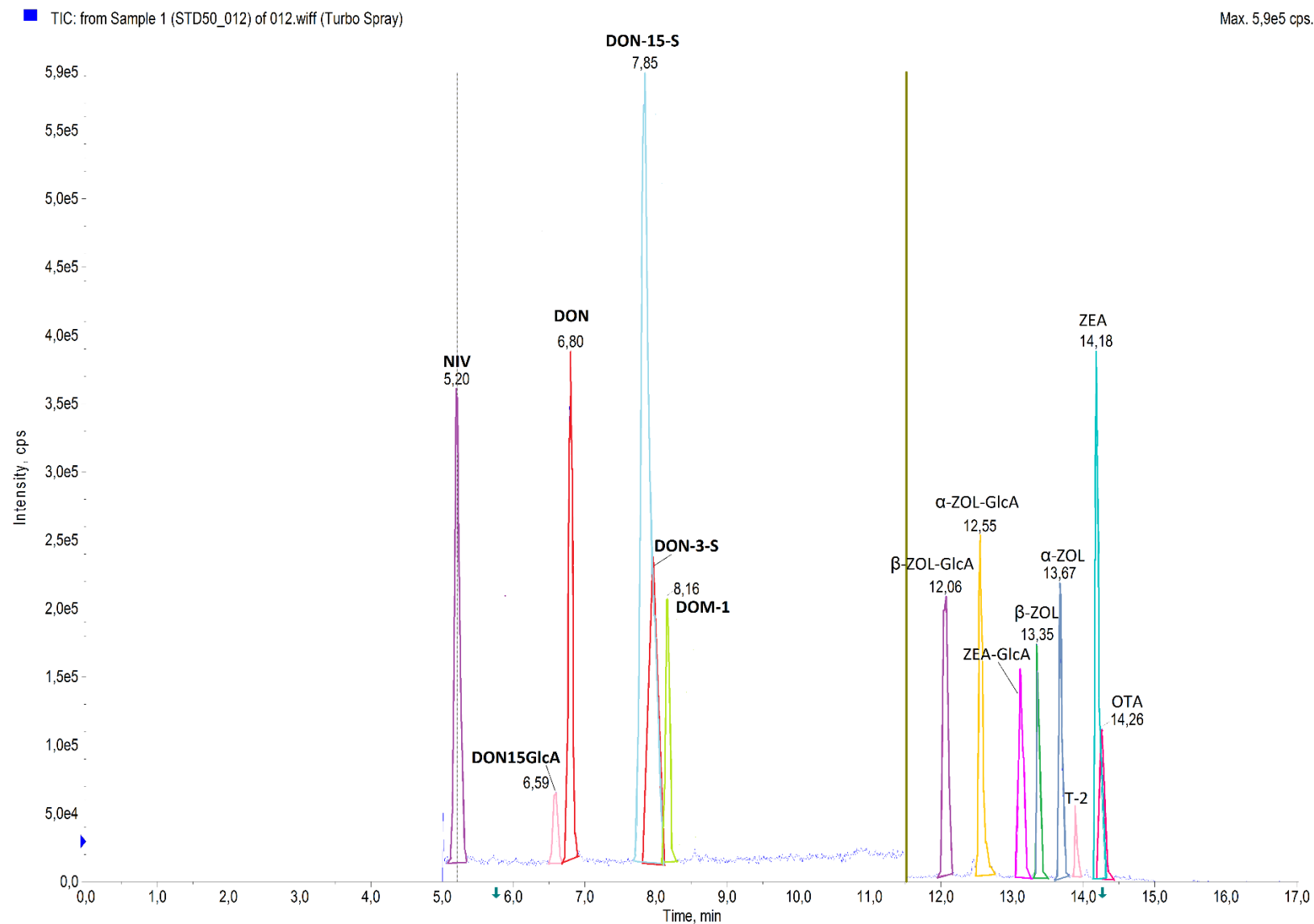
Dva uzorka za kontrolu kvalitete su analizirani u svakoj šarži od 20 uzoraka. Uzorak urina bez mikotoksina je korišten kao kontrola negativnih rezultata, kao i uzorak urina bez mikotoksina obogaćen sa standardom razrjeđenim u omjeru 1:200.

### 3.2.6 Analiza kreatinina

Razina kreatinina u urinu je određena na istom LC-MS/MS uređaju metodom koja je opisana u radu Wartha i sur. (2012a). Ukratko urin je nakon centrifugiranja razrijeđen 1 : 10 000 u dva

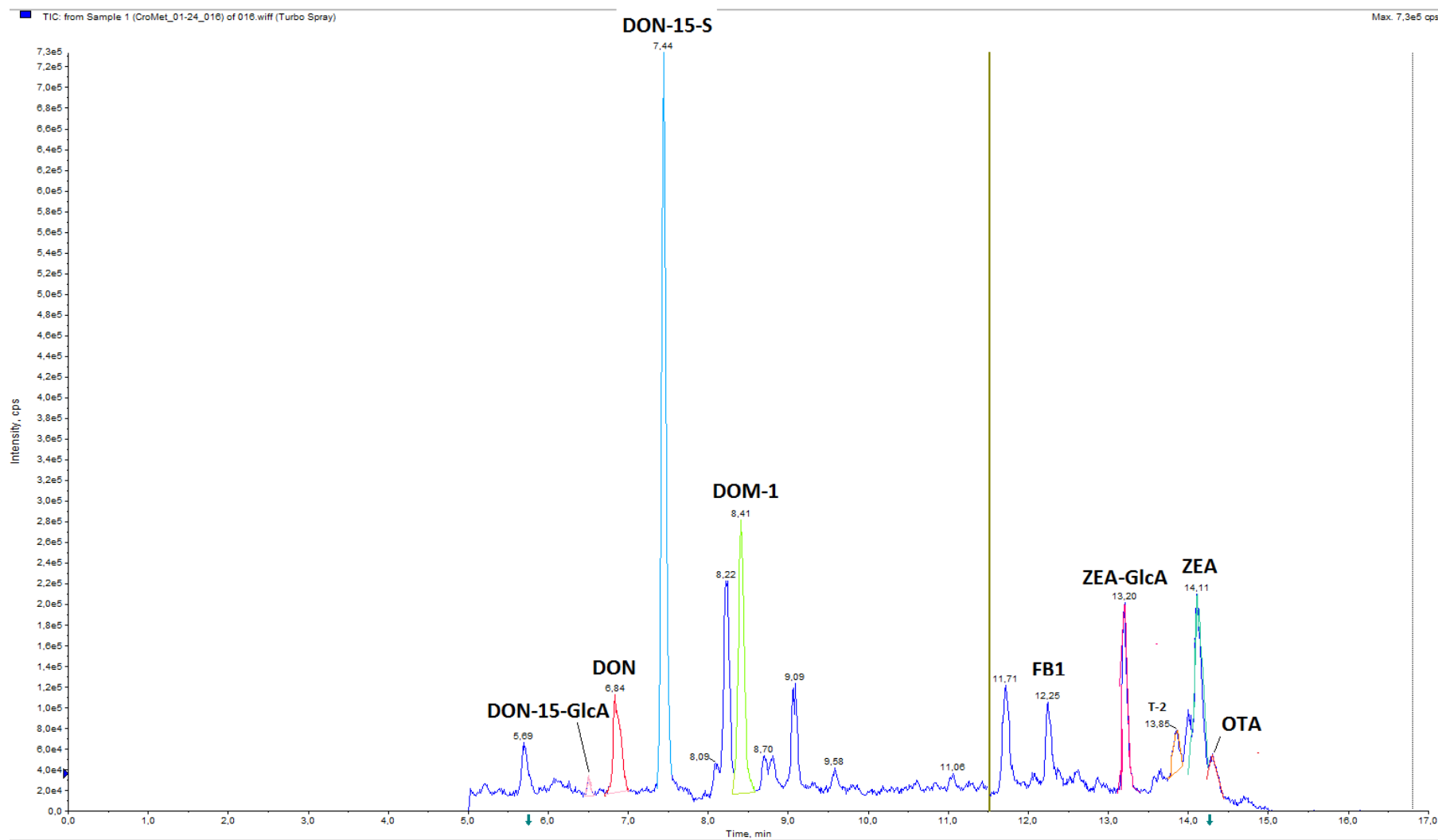
koraka (2 x 1:100), te se takav razrijeđeni direktno prenio u vialu za mjerenje na LC-MS/MS-u gdje je u sustav ubrizgano 5  $\mu\text{L}$ . Određivanje urinarnog kreatinina bilo je potrebno kako bi se uklonio utjecaj količine konzumirane tekućine na koncentraciju biomarkera iz urina. Na taj način je moguće dobivene rezultate usporediti s rezultatima drugih istraživanja. U otopinu za razrjeđivanje dodani su standardi s koncentracijama 10 – 30 – 100 – 300 – 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . 1  $\mu\text{L}$  je injektiran i separiran izokratno na istoj koloni, s istim parametrima rada kao i za biomarkere. Razdvajanje je provedeno s 95% eluenta A tijekom 1,5 min, a kreatinin je izašao iz kolone nakon 1,03 min i ioniziran u pozitivnom ESI načinu rada. Molekula kreatinina je protonirana  $[\text{M}+\text{H}]^+$  i promatrana na  $m/z$  114, a fragmenti na  $m/z$  44,2 i 86,0. Koncentracije urinarnih mikotoksina su kasnije normalizirane na kreatinin i izražene u  $\mu\text{g g}^{-1}$  kreatinina.





Slika 14 Kromatogram standarda u pozitivnom i negativnom modu





Slika 15 Reprezentivni TIC kromatogram uzorka urina u pozitivnom i negativnom modu

**Tablica 9** Koncentracija DON-a, DON-3-GlcA i DON-15-GlcA u uzorcima urina ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

Oznaka uzorka urina	Unos DON-a ( $\mu\text{g dan}^{-1}$ )	D3GlcA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	D15GlcA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DON ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ukupno izlučeni DON ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ukupno izlučeni DON tijekom 24 h ( $\mu\text{g dan}^{-1}$ )	Stopa izlučivanja (%)	Stopa konjugacije (%)
01	110,72	<LOD	87,84	13,46	101,30	209,70	91	87
02	56,64	<LOD	48,25	6,67	54,92	114,79	97	88
03	98,59	<LOD	73,30	4,11	77,41	179,97	79	95
04	119,24	<LOD	85,74	11,09	96,83	268,21	81	89
05	83,91	9,77	69,56	11,15	90,48	121,70	108	88
06	81,76	10,32	37,98	7,25	55,56	33,33	68	87
07	85,17	<LOD	58,64	10,91	69,55	132,15	82	84
09	62,93	13,98	30,81	7,13	51,93	108,01	83	86
10	57,69	3,26	37,35	8,15	48,76	21,45	85	83
12	57,69	<LOD	46,12	1,86	47,98	187,11	83	96
14	144,79	<LOD	99,68	17,45	117,13	377,17	81	85
15	62,93	<LOD	50,94	8,01	58,95	159,17	94	86
16	66,08	<LOD	30,19	<LOD	30,19	117,43	46	100
17	82,64	<LOD	51,10	7,16	58,26	50,98	71	88
18	63,98	1,67	22,71	4,73	29,10	54,13	45	84
19	176,29	18,04	107,94	14,81	140,78	261,86	80	89
20	78,67	<LOD	57,26	9,56	66,82	178,74	85	86
21	57,02	<LOD	28,89	2,03	30,92	68,17	54	93
22	110,13	<LOD	91,00	12,03	103,03	125,18	94	88
54	43,34	<LOD	36,48	4,23	40,71	48,85	94	90
58	68,18	<LOD	60,25	7,14	67,39	57,96	99	89
59	69,23	<LOD	65,46	6,31	71,77	103,71	104	91
60	75,06	<LOD	77,71	11,16	88,87	165,30	118	87
61	57,69	4,91	50,98	2,40	58,28	100,25	101	96
62	71,32	<LOD	78,27	10,50	88,77	157,12	124	88
63	65,03	<LOD	53,60	8,05	61,65	88,16	95	87
64	68,18	<LOD	30,35	4,38	34,73	45,84	51	87
65	99,00	<LOD	70,92	7,76	78,67	170,72	79	90
66	69,57	13,78	40,45	3,45	57,68	23,07	83	94
67	100,69	<LOD	75,99	2,21	78,19	127,45	78	97
68	68,18	<LOD	62,60	1,79	64,39	109,47	94	97
69	80,64	<LOD	32,48	4,83	37,31	80,59	46	87
70	98,22	<LOD	79,13	12,56	91,69	123,79	93	86
71	68,18	<LOD	61,35	8,26	69,62	130,18	102	88
72	75,52	<LOD	64,99	7,42	72,41	114,41	96	90
74	105,61	<LOD	33,93	4,18	38,11	39,26	36	89
75	118,49	<LOD	54,71	6,33	61,04	56,15	52	90
76	89,72	<LOD	104,09	13,62	117,70	143,60	131	88
77	69,18	<LOD	24,55	4,71	29,26	46,23	42	84

Tablica 9 (nastavak)

Oznaka	Unos DON-a ( $\mu\text{g dan}^{-1}$ )	D3GlcA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	D15GlcA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DON ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ukupno izlučeni DON ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ukupno izlučeni DON tijekom 24 h ( $\mu\text{g dan}^{-1}$ )	Stopa izlučivanja (%)	Stopa konjugacije (%)
78	121,90	<LOD	85,85	11,95	97,80	336,45	80	88
79	120,05	<LOD	70,31	4,92	75,23	46,65	63	93
80	88,11	<LOD	79,46	11,46	90,92	254,56	103	87
81	143,11	<LOD	39,02	7,71	46,74	106,10	33	83
82	110,13	<LOD	108,12	12,79	120,91	348,22	110	89
83	48,46	<LOD	67,66	4,63	72,30	123,63	149	94
84	65,91	<LOD	43,03	5,75	48,78	53,66	74	88
85	56,64	<LOD	41,91	8,19	50,09	55,85	88	84
86	118,52	<LOD	59,02	6,25	65,26	164,79	55	90
87	90,20	<LOD	48,93	7,68	56,60	130,75	63	86
Prosjek	85,33	1,55	59,53	7,55	68,63	129,02	82	89

Iako je metodom analizirano 18 mikotoksina što se vidi na **Slici 14** koja prikazuje kromatogram standarda te **Slici 15** koja prikazuje kromatogram reprezentativnog uzorka urina, u ovom radu je naglasak na DON-u i njegovim metabolitima: DON-3-GlcA i DON-15-GlcA čije su koncentracija ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), stopa izlučivanja (%) i stopa konjugacije (%) obuhvaćena **Tablicom 9**. U ispitivanju je sudjelovalo 49 ispitanika čiji je prosječan dnevni unos DON-a bio  $85,33 \mu\text{g dan}^{-1}$  s rasponom  $43,34 - 176,29 \mu\text{g dan}^{-1}$ . Ukupno izlučeni DON tijekom 24 sata je u prosjeku bio  $129,02 \mu\text{g dan}^{-1}$ , s rasponom  $21,45 - 377,17 \mu\text{g dan}^{-1}$ . Koncentracija izlučenog ukupnog DON-a (DON + GlcA) u urinu je bila prosječno  $68,63 \mu\text{g L}^{-1}$  s rasponom  $29,10 - 140,78 \mu\text{g L}^{-1}$  što je i po nekoliko puta više u odnosu na slična istraživanja metabolizma DON-a na ljudima.

Iz rezultata je vidljivo da se DON unesen u organizam putem proizvoda na bazi žitarica najviše urinom izlučuje u obliku DON-15-GlcA, prosječno  $59,53 \mu\text{g L}^{-1}$  (raspon  $24,55 - 108,12 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Udio koji DON-15-GlcA čini u ukupno izlučenom DON-u je 86,74%. U istraživanju Wartha i sur. (2012a) DON-15-GlcA je činio 75% od ukupno izlučenog DON-a. DON se u ovom istraživanju u slobodnom obliku izlučio u koncentraciji od  $7,55 \mu\text{g L}^{-1}$  (raspon  $<\text{LOD} - 17,45 \mu\text{g L}^{-1}$ ) i to je 11% ukupno izlučenog DON-a, što je u skladu s rezultatima Wartha i sur. (2013) koji su izvijestili o 9% DON-a izlučenog u slobodnom obliku analiziranjem urina jedne osobe. Može se provesti i usporedba s rezultatima dobivenim na urinu 40 trudnica iz Hrvatske (Šarkanj i sur., 2013) gdje je također koncentracija DON-15-GlcA bila oko 8 puta veća od koncentracije slobodnog DON-

a. Kod većeg dijela ispitanika je izlučivanje DON-3-GlcA bilo ispod limita detekcije i činilo je ukupno  $1,55 \mu\text{g L}^{-1}$  (raspon  $<\text{LOD} - 18,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ), što je u postotku prosječno 2,26%.

Stopa izlučivanja je u prosjeku bila 82% s rasponom 36 – 149% pa je pretpostavka da se ispitanici nisu pridržavali plana prehrane te su možda konzumirali još neke namirnice koje su bile kontaminirane deoksinivalenolom ili su zbog heterogene distribucije mikotoksina dobili uzorak s nešto više DON-a od izračunatog. Ukoliko bi se iz grupnog prosjeka izbacili ispitanici koji su imali stopu izlučivanja veću od 100%, tada bi se prosjek stope izlučivanja snizio na 76% što je u skladu s ostalim istraživanjima. Turner i sur. (2011) su radili analizu prvog jutarnjeg urina koji je koncentriraniji i stopa izlučivanja im je bila 72%, ali je u istraživanju sudjelovao veći broj ispitanika, dok su Warth i sur. (2012a) imali stopu izlučivanja od 68% koristeći 24-satni urin te su nižu stopu izlučivanja objasnili time da je prvi jutarnji urin koncentriraniji od 24-satnog te činjenicom da je u potonjoj studiji analiziran urin jednog ispitanika. Među ispitanicima je nekoliko sa stopom izlučivanja nižom od 50% te se po rezultatima iz tablice može zaključiti da unos DON-a nije utjecao na stopu izlučivanja iako bi se sav trebao izlučiti tijekom 24 sata. Dio ispitanika možda nije pojeo svu hranu koju su trebali ili je na izlučivanje utjecao neki zdravstveni problem za koji nisu znali.

Prosjek stope konjugacije DON-a u glukuronide iznosi 89% s rasponom 83 – 100%. Warth i sur. (2012a) su izvijestili o nižoj stopi glukuronidacije (86%) u odnosu na rezultate Turner i sur. (2011) koji su imali 91%, ali su ovo Warth i sur. (2012a) objasnili unosom hrane s većom koncentracijom DON-a ( $138 \mu\text{g dan}^{-1}$ ). Ispitanici obuhvaćeni ovim istraživanjem su imali prosječan unos od  $85,33 \mu\text{g dan}^{-1}$  pa bi se moglo pretpostaviti da su konzumirali sličnu koncentraciju DON-a kao Turnerovi ispitanici (on nije navodio kolika je točna unesena koncentracija DON-a). Moguća je i genetska predispozicija većoj efikasnosti glukuronidacije s obzirom na zemljopisno podrijetlo. Varijacije u stopi konjugacije su puno manje nego u stopi izlučivanja i podudaraju se s rezultatima drugih istraživanja (Turner i sur., 2011; Warth i sur., 2012a.).

**Tablica 10** Procjena izloženosti ispitanika ( $\mu\text{g kg tjelesne mase}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ )

		Unos DON-a ( $\mu\text{g dan}^{-1}$ )	DON-3-GlcA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DON-15-GlcA ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DON ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ukupno izlučeni DON ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ukupno izlučeni DON tijekom 24 h ( $\mu\text{g dan}^{-1}$ )	Stopa izlučivanja (%)	Stopa konjugacije (%)
ukupno (n=49)		85,33	1,55	59,53	7,55	68,63	129,02	82	89
dob	22-30 (n=21)	88,33	1,38	60,32	7,46	69,16	132,45	83	89
	31-40 (n=24)	80,85	1,88	57,20	7,55	66,62	126,01	83	89
	41-52 (n=4)	96,38	0,42	69,38	8,11	77,91	129,11	77	89
spol	M (n=19)	104,85	1,46	77,32	10,12	88,91	185,73	87	89
	Ž (n=30)	72,96	1,60	48,26	5,93	55,79	93,10	80	89
BMI	pothranjeni (n=4)	67,24	6,03	42,66	5,01	53,70	56,57	86	90
	normalno uhranjeni (n=34)	82,30	1,52	57,43	7,56	66,51	124,11	83	89
	prekomjerna masa (n=5)	97,52	<LOD	61,32	8,87	70,19	135,14	74	88
	pretili (n=6)	104,36	<LOD	81,15	8,14	89,29	200,03	86	91
pušenje	pušači (n=15)	73,35	2,98	52,13	6,49	61,60	106,50	87	89
	nepušači (n=34)	90,61	0,91	62,79	8,02	71,73	138,96	81	89
prehrana	LOV* (n=5)	76,51	2,76	58,68	7,89	69,33	94,29	88	89
	OMN** (n=30)	89,38	1,90	58,31	7,94	68,15	142,90	78	88
	VEG*** (n=14)	79,78	0,35	62,44	6,61	69,40	111,69	89	90
primanja	1000-3000 (n=16)	78,74	2,25	60,66	7,52	70,42	130,31	90	89
	3001-6000 (n=21)	82,41	0,08	57,80	6,89	64,77	122,47	80	89
	6001-9000 (n=5)	113,79	5,67	58,94	9,57	74,18	116,88	67	86
	>9001 (n=5)	82,56	1,95	65,98	8,68	76,61	157,07	94	89
edukacija	SSS (n=11)	91,95	0,74	72,01	8,26	81,01	121,49	91	90
	VSS (n=32)	83,57	2,11	56,49	7,67	66,27	129,87	81	89
	VŠS (n=6)	82,56	<LOD	52,86	5,66	58,53	138,30	77	90

\*lactoovovegeterijanska

\*\*omnivorska

\*\*\*veganska

U **Tablici 10** se nalaze isti podaci o procjeni izloženosti DON-u, ali podijeljeni na kategorije. U istraživanju je sudjelovalo 19 muških i 30 ženskih osoba. Unos DON-a je viši kod muških osoba, ali i stopa izlučivanja koja je kod muških osoba bila prosječno 87%, a kod ženskih 80%, dok je stopa konjugacije bila jednaka kod oba spola (89%).

Kod podjele ispitanika na dobne kategorije (22 – 30; 31 – 40; 41 – 52 godine), vidljivo je da je kod starijih osoba prosječan unos DON-a bio veći zbog veće tjelesne mase, ali je stopa izlučivanja od 77% niža u odnosu na mlađe ispitanike (83%) što bi moglo značiti da je dob bitan faktor kod izlučivanja DON-a tj. starenjem dolazi do slabljenja fizioloških procesa.

Veći unos DON-a kod pothranjenih osoba je rezultirao i većom stopom konjugacije u DON-3-GlcA u odnosu na druge kategorije ispitanika. Kod njih je koncentracija DON-3-GlcA bila 6,03  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a to je 11,23% od ukupno izlučenog DON-a. DON-3-GlcA se pojavljivao samo u urinu osoba koje su unosile veće koncentracije DON-a hranom jer se i inače pojavljuje u nižim koncentracijama, a detektirane koncentracije su bile blizu limita detekcije.

Kod pušača je također bila veća konjugacija u DON-3-GlcA. Ukupna stopa konjugacije je bila jednaka kod pušača i nepušača (89%), pa se veća konjugacija u DON-3-GlcA može pripisati drugim faktorima poput indukcije dodatnih izoenzima UGT-a uslijed izlaganja toksikantima iz duhanskog dima.

Među ispitanicima je bilo 5 laktoovovegeterijanaca, 30 omnivora te 14 vegana. Stopa izlučivanja je varirala od 78% za omnivore, 88% za laktoovovegetarijance do 89% za vegane. Zanimljivo je primijetiti da je i stopa konjugacije varirala tako da je najniža kod omnivora (88%), zatim kod laktoovovegeterijanaca (89%) i najviša kod vegana (90%). Iako je broj ispitanika premali da bi se donosili generalni zaključci o tome kako način prehrane utječe na konjugaciju, moguće je da su se vegani i vegetarijanci povećanom stopom konjugacije prilagodili povećanom unosu DON-a hranom, ali i povećanom unosu fitokemikalija koje potiču ekspresiju metaboličkih enzima.

U kategoriji primanja koja je podijeljena na 4 podskupine te kategorijama edukacije (SSS, VSS, VŠŠ ) se nalaze najrazličitiji podaci o izloženosti, izlučivanju i konjugaciji DON-a, međutim, teško je procijeniti koji od faktora najviše utječe na te razlike. Sociološki faktori kao što su obrazovanje, utjecaj društva, kultura, ekonomski status i slobodno vrijeme utječu na odabir i količinu namirnica.



Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Prosječna stopa izlučivanja DON-a urinom iznosila je 82%,
2. DON unesen u organizam putem proizvoda na bazi žitarica najviše se urinom izlučuje u obliku DON-15-GlcA, prosječne koncentracije  $59,53 \mu\text{g L}^{-1}$  s rasponom 24,55 – 108,12  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Udio koji DON-15-GlcA čini u ukupno izlučenom DON-u je prosječno 86,74%,
3. Od ukupno izlučenog DON-a u urinu, 11% je u obliku slobodnog DON-a (prosječne koncentracije  $7,55 \mu\text{g L}^{-1}$  s rasponom <LOD – 17,45  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), a ostalo su njegovi glukuronidi,
4. Odnos izlučenog DON-15-GlcA i slobodnog DON-a je otprilike 8:1,
5. Kod većeg broja ispitanika je DON-3-GlcA ispod limita detekcije i čini udio od 2,26% ukupno izlučenog DON-a s prosječnom koncentracijom od  $1,55 \mu\text{g L}^{-1}$  i rasponom <LOD – 18,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Razlog tome je što se DON-3-GlcA pojavljuje samo u urinu osoba koje su unosile prehranom veće koncentracije DON-a,
6. Stopa konjugacije je u pravilu jednaka kod svih, iako se mogu primjetiti male razlike između omnivora te vegana i laktoovovegetarijanaca,
7. Na stopu izlučivanja utječu brojni faktori kao što su: unos DON-a, spol, dob, tjelesna masa, pušenje, način prehrane te sociološki faktori koji utječu na odabir hrane.





- Alfa Aesar: *Products – Creatinine*. Alfa Aesar, 2016.  
<https://www.alfa.com/en/catalog/B23097/> [31.5.2016.]
- Banerjee S, Mazumdar S: Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* 2012:282574, 2012.
- Battilani P, Rossi V, Giorni P, Pietri A, Gualla A, van der Fels-Klerx HJ, Booij CJH: Scientific report submitted to EFSA, Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. EFSA, 2012.  
[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/223e.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/223e.pdf) [23.6.2016.]
- Baughman K: *UHPLC (Ultra-High Pressure Liquid Chromatography) in the Analytical Chemistry Laboratory*. Microbac Laboratories, 2011. <https://www.microbac.com/search-results?q=UHPLC> [9.5.2016.]
- Bhat RV, Ramakrishna Y, Beedu SR, Munshi KL: Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mold-damaged wheat products in Kashmir Valley, India. *Lancet* 1:35–37, 1989.
- Budimir J: Određivanje granice kvantifikacije antibiotika u medu vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa. *Diplomski rad*. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
- Chemicool: *Definition of Quadrupole mass spectrometry*. 2016.  
[http://www.chemicool.com/definition/quadrupole\\_mass\\_spectrometry.html](http://www.chemicool.com/definition/quadrupole_mass_spectrometry.html)  
 [30.5.2016.]
- Döll S, Dänicke S, Valenta H: Residues of deoxynivalenol (DON) in pig tissue after feeding mash or pellet diets containing low concentrations. *Molecular Nutrition & Food Research* 52:727-734, 2008.
- Döll S, Dänicke S: The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Preventive Veterinary Medicine* 102:132-145, 2011.
- Eriksen GS, Pettersson H, Lindberg JE: Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl don in pigs. *Archives of Animal Nutrition* 57:335-345, 2003.

- Eriksen GS, Pettersson H: Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 114:205-239, 2004.
- European Food Safety Authority (EFSA): *Scientific report of EFSA - deoxynivalenol in food and feed: occurrence and exposure*. EFSA Journal, 2013.
- FAO Corporate document repository, Bhat RV i Miller JD: *Mycotoxins and food supply*. FAO, 2016. <http://www.fao.org/docrep/U3550t/u3550t0e.htm> [16.6.2016.]
- Folske D: *Fusarium Head Blight (FHB=Scab) Forecasting*. North Dakota State University, 2012. <https://www.ag.ndsu.edu/burkecountyextension/crops/fusarium-head-blight-fhb-scab-forecasting> [30.5.2016.]
- Gross JH: Introduction. In *Mass spectrometry - A Textbook*. Springer, 2004.
- Hrvatska agencija za hranu (HAH): *Znanstveno mišljenje o mikotoksinima u hrani za životinje*. HAH, 2012.
- Jajić I, Jurić V, Abramović B: First survey of deoxynivalenol occurrence in crops in Serbia. *Food Control* 19:545-550, 2008.
- King RR, McQueen RE, Levesque D, Greenhalgh R: Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 32:1181-1183, 1984.
- Klapec T, Šarkanj B: *Opasnosti vezane uz hranu – kemijske i fizikalne opasnosti*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, 2016.
- Luo Y, Yoshizawa T, Katayama T: Comparative study on the natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high-risk and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology* 56:3723–3726, 1990.
- Madeira P, Florêncio M: Applications of tandem mass spectrometry: From structural analysis to fundamental studies. In *Tandem mass spectrometry – applications and principles*. InTech, 2012.
- Maul R, Warth B, Kant J, Schebb N, Krska R, Kocht M, Sulyok M: Investigation of the hepatic glucuronidation pattern of the fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various species. *Chemical Research in Toxicology* 25:2715-2717, 2012.

- Meky F, Turner PC, Ashcroft A, Miller J, Qiao Y, Roth M, Wild CP: Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. *Food and Chemical Toxicology* 41:265-273, 2003.
- Mitak M, Zadavec M, Karačić V: Prirodna kontaminacija deoksinivalenolom (vomitoksinom) kukuruza roda 1999. godine. *Krmiva* 45:77-79, 2003.
- Nagl V, Woechtl B, Schwartz-Zimmermann HE, Hennig-Pauka I, Moll WD, Adam G, Berthiller F: Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs. *Toxicology Letters* 229:190-197, 2014.
- Narayanan S, Appleton HD: Creatinine: A review. *Clinical Chemistry* 26:1119-1126, 1980.
- Nijs MD, Top, V, Portier L, Oegema G, Kramer E, Egmond HP, Hoogenboom LAP: Digestibility and absorption of deoxynivalenol-3- $\beta$ -glucoside in *in vitro* models. *World Mycotoxin Journal* 5:319-324, 2012.
- Ožegović L, Pepeljnjak S: *Mikotoksikoze*. Školska knjiga, 1995.
- Pestka JJ: Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archives of Toxicology* 84:663-679, 2010.
- Pioneer: *Facts on Gibberella Ear Rot*. Pioneer, 2016.  
<https://www.pioneer.com/home/site/ca/agronomy/crop-management/corn-insect-disease/gibberella-ear-rot/> [12.5.2016]
- Pleadin J, Sokolović M, Perši N, Zadavec M, Jaki V, Vulić A: Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control* 28:94-98, 2012.
- Pleadin J, Vahčić N, Perši N, Ševelj D, Markov K, Frece J: *Fusarium* mycotoxins occurrence in cereals harvested from Croatian Fields. *Food Control* 32:49-54, 2013.
- Pratima NA, Shraddha B, Zibran S: Review of ultra performance liquid chromatography and its applications. *International Journal of Research in Pharmacy and Science* 3:19-40, 2013.
- Prelusky DB, Hartin KE, Trenholm HL, Miller JD: Pharmacokinetic fate of  $^{14}\text{C}$ -Labeled deoxynivalenol in swine. *Toxicological Sciences* 10:276-286, 1987.
- Prelusky DB, Veira DM, Trenholm HL, Foster BC: Metabolic fate and elimination in milk, urine and bile of deoxynivalenol following administration to lactating sheep. *Journal of*

- Enviromental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 22:125-148, 1987.
- Purde M-T, Nock S, Risch L, Medina Escobar P, Gebhardt C, Nydegger U, Stanga Z, Risch M: The cystatin C/creatinine ratio, a marker of glomerular filtration quality: associated factors, reference intervals, and prediction of morbidity and mortality in healthy seniors. *Translational Research* 169:80-92, 2016.
- Quareshi H, Shehzad A, Moshin R, Sultan G, Laghari R, Muburak M, Hashmi A, Naqvi S, Rizvi S: Impact of radical nephrectomy on renal functional outcome in patients with no other co-morbidity as determined by 24-h urinary creatinine clearance. *African Journal of Urology* 21:210-213, 2015.
- Rocha MEB, Freire FCO, Maia FEF, Guedes MIF, Rondina D: Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36:159-165, 2014.
- Rodrigues E, Mirocha CJ, Xie W, Krick TP, Martinelli JA: Electron ionization mass spectral fragmentation of deoxynivalenol and related trihotecenes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16:1827-1835, 2002.
- Rychlik M, Humpf HU, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, Klaffke H, Lorenz N: Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including „masked“ mycotoxins. *Mycotoxin Research* 30:197-205, 2014.
- Schwartz-Zimmermann HE, Fruhmann P, Dänicke S, Wiesenberger G, Caha S, Weber J, Berthiller F: Metabolism of deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol in broiler chickens, pullets, roosters and turkeys. *Toxins* 7:4706-4729, 2015.
- Šarkanj B, Warth B, Uhlig S, Abia WA, Sulyok M, Klappec T, Krska R, Banjari I: Urinary analysis reveals high deoxynivalenol exposure in pregnant women from Croatia. *Food and Chemical Toxicology* 62:231-237, 2013.
- Šarkanj B: Utjecaj inhibitora glutation S – transferaze na proukciju aflatoksina plijesni *Aspergillus flavus*. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Taleuzzaman M, Ali S, Gilani SJ, Imam SS, Hafeez A: Ultra performance liquid chromatography (UPLC) – A review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry* 2:1056, 2015.

- Turner PC, Burley V, Rothwell JA, White KLM, Cade JE, Wild CP: Deoxynivalenol: Rationale for development and application of a urinary biomarker. *Food Additives and Contaminants: Part A* 25:864-871, 2008.
- Turner PC, Hopton R, White KLM, Fisher J, Cade JE, Wild CP: Assessment of deoxynivalenol metabolite profiles in UK adults. *Food and Chemical Toxicology* 49:132,135, 2011.
- Turner PC, Hopton RP, Lecluse Y, White KLM, Fisher J, Lebailly P: Determinants of urinary deoxynivalenol and de-epoxy deoxynivalenol in male farmers from Normandy, France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:5206-5216, 2010.
- Turner PC, Rothwell JA, Gong YY, Cade JE, Wild CP: Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives* 116:21-25, 2008.
- Turner PC, White LKM, Burley VJ, Hopton RP, Rajendram A, Fisher J, Cade JE, Wild CP: A comparison of deoxynivalenol intake and urinary deoxynivalenol in UK adults, *Biomarkers* 15:553-562, 2010.
- Turner PC, Westhuizen L, Da Costa A: Biomarkers of exposure: Mycotoxins – aflatoxin, deoxynivalenol and fumonisins. In *Biomarkers and Human Biomonitoring*. Royal Society of Chemistry, Maryland, USA, 2012.
- Uhlig S, Ivanova L, Fæste CK: Enzyme-assisted synthesis and structural characterization of the 3-, 8-, and 15-glucuronides of deoxynivalenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:2006-2012, 2013.
- Varga E: Validation and application of an LC-MS/MS based multi-target method for the determination of mycotoxins in nuts and dried grapes. *Diplomski rad*. University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Beč, 2010.
- Vidal A, Sanchis V, Ramos A, Marin S: Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. *Food Chemistry* 178:276-286, 2015.
- Warth B, Fruhmman P, Wiesenberger G, Kluger B, Šarkanj B, Lemmens M, Hametner C, Frolich J, Adam G, Krska R, Schuhmacher R: Deoxynivalenol-sulfates: identification and

- quantification of novel conjugated (masked) mycotoxins in wheat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:1033-1039, 2015.
- Warth B, Sulyok M, Berthiller F, Schuhmacher R, Fruhmann P, Hametner C, Adam G, Fröhlich J, Krska R: Direct quantification of deoxynivalenol glucuronide in human urine as biomarker of exposure to the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401:195-200, 2011.
- Warth B, Sulyok M, Berthiller F, Schuhmacher R, Krska R: New insights into the human metabolism of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicology Letters* 220:88-94, 2013.
- Warth B, Sulyok M, Fruhmann P, Berthiller F, Schuhmacher R, Hametner C, Adam G, Fröhlich J, Krska R: Assessment of human deoxynivalenol exposure using LC-MS/MS based biomarker method. *Toxicology Letters* 211:85-90, 2012.
- Warth B, Sulyok M, Fruhmann P, Mikula H, Berthiller F, Schuhmacher R, Hametner C, Abia WA, Adam G, Fröhlich J, Krska R: Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26:1533-1540, 2012.
- Waters – The science of what's possible: *HPLC Separation Modes*. Waters, 2016.  
[http://www.waters.com/waters/en\\_HR/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en\\_HR](http://www.waters.com/waters/en_HR/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_HR) [30.5.2016.]
- WHO: *Global database on body mass index*. WHO, 2016.  
[http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html) [13.07.2016.]
- Worrell NR, Mallett AK, Cook WM, Baldwin NC, Shephard MJ: The role of gut micro-organisms in the metabolism of deoxynivalenol administered to rats. *Xenobiotica* 19:25-32, 1989.
- Wu Q, Dohnal V, Huang L, Kuča K, Yuan Z: Metabolic pathways of trihotecenes. *Drug Metabolism Reviews* 42:250-267, 2010.
- Yoshizawa T, Cote LM, Swanson SP, Buck WB: Confirmation of DOM-1, a deepoxidation metabolite of deoxynivalenol, in biological fluids of lactating cows. *Agricultural and Biological Chemistry* 50:227-229, 1986.

Yoshizawa T, Takeda H, Ohi T: Structure of a novel metabolite from deoxynivalenol, a trichothecene mycotoxin, in animals. *Agricultural and Biological Chemistry* 47:2133-2135, 1983.